

Université PARIS V

DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES DE PHYSIOLOGIE
DE LA REPRODUCTION

1997-1998

Présenté par

Pascal Michel MOCK

ETUDE DE L'EXPRESSION DE EARLY PLACENTA INSULIN-LIKE
(EPIL), PRODUIT DU GENE INSL4,
AU NIVEAU DU PLACENTA ET DE L'UTERUS

Responsable Scientifique:

Professeur Jean-Michel BIDART

Laboratoire d'Immunologie, URA CNRS 1484
Faculté des Sciences Pharmaceutiques & Biologiques
Université René Descartes

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier :

Monsieur le Professeur Dominique Bellet, Chef du Département de Biologie Clinique à l'Institut Gustave Roussy, pour m'avoir accueilli dans son équipe et pour avoir partagé avec moi des instants inoubliables de "Science" pendant presque deux ans,

Monsieur le Professeur Jean-Michel Bidart, responsable de cette étude, qui, avec son extrême compétence, a guidé mon enthousiasme de clinicien tout au long de ce projet de recherche,

Monsieur le Professeur René Frydman, Chef du Département de Gynécologie et d'Obstétrique (Hôpital Antoine Béchère), à l'origine de mon "expérience parisienne", me permettant, notamment, de poursuivre en tant qu'interne une activité de recherche,

Monsieur le Docteur Frédéric Troalen qui, par ses discussions enthousiastes et passionnées, a contribué à attiser mon esprit de chercheur,

Monsieur le Docteur Jean-Christophe Sabourin, pour son amabilité et sa disponibilité,

Monsieur Jean-Louis Janneau qui, par sa compétence, sa gentillesse et sa disponibilité, a beaucoup contribué à l'aboutissement de ce travail,

Monsieur Jean-Louis Bobot, pour m'avoir aidé à apprivoiser les différentes techniques nécessaires pour la réalisation de ce projet,

Mesdames Yannick Smith, Mireille Lemaout et Monsieur Jean-Pierre Levillain pour avoir produit et caractérisé les outils m'ayant permis de réaliser ce travail,

Madame Olivia Roux, pour son professionnalisme, sa disponibilité et son humeur constante,

...et tous les membres du laboratoire d'Immunologie de la Faculté de Pharmacie et du Département de Biologie Clinique de l'Institut Gustave Roussy, pour leur accueil chaleureux, leurs compétences, leur aide et leurs encouragements.

ABREVIATIONS

ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
ARN	Acide RiboNucléique
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
EPIL	Early Placenta Insulin-Like
FGF	Fibroblast Growth Factor
FSH	Follicule-Stimulating Hormone
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
IGF	Insulin Growth Factor
IGFBP	Insulin Growth Factor Binding Protein
IL	Interleukine
IRMA	Immunoradiometric assay
MMP	Métallo protéinase de la matrice
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PRL	Prolactine
RLX	Relaxine
SA	Semaines d'aménorrhée
TBS	Tris Buffer Salin
TGF	Transforming Growth Factor

CONVENTION

Nous avons utilisé la nomenclature à une lettre pour l'écriture des séquences peptidiques.

Rappel de la nomenclature

Alanine	A
Arginine	R
Asparagine	N
Ac. Aspartique	D
Ac. glutamique	E
Cystéine	C
Glutamine	Q
Glycine	G
Histidine	H
Isoleucine	I
Leucine	L
Lysine	K
Méthionine	M
Phénylalanine	F
Proline	P
Sérine	S
Thréonine	T
Tryptophane	w
Tyrosine	y
Valine	V

TABLE DES MATIERES

1.	INTRODUCTION.....	5
1.1.	Implantation et développement placentaire précoce.....	5
1.2.	Endomètre maternel et décidualisation.....	6
1.3.	Décidualisation et invasion trophoblastique.....	6
1.4.	Facteurs de croissance.....	6
1.5.	Le gène INSL4 et son produit Early Placenta Insulin-like.....	7
2.	BUT ET STRATEGIE DE L'ETUDE.....	10
3.	MATERIEL ET METHODES.....	10
3.1.	Production des peptides synthétiques.....	10
3.2.	Production d'anticorps polyclonaux et monoclonaux.....	11
3.2.1.	Immunisation et production d'anticorps polyclonaux.....	11
3.2.2.	Immunisation et production d'anticorps monoclonaux.....	11
3.3.	Caractérisation immunochimique des anticorps.....	12
3.4.	Etude de la localisation cellulaire/tissulaire ainsi que de la détection dans les liquides biologiques de la protéine EPIL putative.....	12
3.4.1.	Immunohistochimie.....	12
3.4.2.	Immunoanalyse.....	13
4.	RESULTATS.....	13
4.1.	Production et caractérisation des anticorps.....	13
4.1.1.	Production et caractérisation des anticorps polyclonaux contre le peptide 59-108Y de la chaîne C.....	13
4.2.	Détection par immunohistochimie de la protéine EPIL.....	16
4.2.1.	Villosités choriales et cordon ombilical.....	16
4.2.2.	Utérus, endomètre et décidue.....	17
4.3.	Détection par immunoanalyse de la molécule EPIL dans les liquides biologiques.....	18
4.3.1.	Construction du dosage radio métrique.....	18
4.3.2.	Dosage des formes moléculaires de la protéine EPIL dans les liquides biologiques.....	18
5.	DISCUSSION.....	19
6.	BIBLIOGRAPHIE.....	23

1. INTRODUCTION

Chez les Mammifères, l'implantation du blastocyste au niveau de l'endomètre ainsi que le développement placentaire permettent au travers d'une série d'événements précis et complexes de connecter l'embryon à sa mère.

Récemment, il est apparu que le placenta ainsi que les tissus intra-utérins tels que la décidue et les membranes foetales (chorion et amnion) jouent un rôle clé dans l'implantation et le développement de l'unité foeto-placentaire. C'est, en effet, par l'intermédiaire d'un réseau de facteurs d'une grande diversité tels que des neurohormones, hormones peptidiques, facteurs de croissances ou cytokines synthétisés par ces tissus et de leurs interactions complexes que résulte le succès de l'implantation ainsi que de la gestation (Petraglia et al., 1996).

Bien que le placenta soit la source d'un nombre important de facteurs peptidiques, seuls certains facteurs apparaissent être de véritables régulateur de l'implantation et du développement placentaire (Cross et al., 1994).

1.1. Implantation et développement placentaire précoce

Au stade précoce de son développement la villosité chorale constitue l'unité anatomique et fonctionnelle du placenta. Elle est constituée d'un axe de tissu conjonctif avec des cellules mésenchymateuses, des macrophages foetaux (cellules de Hofbauer) ainsi que des vaisseaux embryonnaires entourée par une double assise cellulaire : une couche interne, les cellules cytotrophoblastiques villositaires mononuclées (CTV, couche interne) de phénotype prolifératif ainsi qu'une couche externe, les cellules syncytiotrophoblastiques multinuclées (SCT, couche externe) proliférant peu. Les cellules cytotrophoblastiques extravilleuses sont définies comme étant de localisation autre que villositaires telles que les colonnes des villosités crampons, la décidue ou la paroi des vaisseaux maternels (Zhou et al., 1997a).

C'est au cours de la phase de pénétration du processus de l'implantation que ces cellules cytotrophoblastiques extravilleuses (CTE) avec leur capacité invasive permettent la formation du placenta hémochorial. Il est actuellement admis que le processus d'invasion des cellules trophoblastiques dépend de leur capacité à dégrader la matrice extracellulaire endométriale (Fisher et al., 1985 ; Bischof and Martelli, 1992). En effet, il a été démontré que des protéases comme le système plasmine (Sappino et al., 1989) ou les métalloprotéinases de la matrice (MMP) (Librach et al., 1991) étaient sécrétées in vivo et in vitro par les cytotrophoblastes (CT). La différenciation des cytotrophoblastes extravilleux (CTE) en cellules à phénotype invasif semble être dépendante de la régulation spatiotemporelle de molécules d'adhérence (intégrines, cadhérines, superfamille des immunoglobulines et sélectines) ainsi que des composants de la matrice extracellulaire (Kaufmann, P. and Castellucci, M., 1997). Alors que l'on ne connaît pas les signaux d'initiation du programme de différenciation des CT, une diminution de l'invasion interstitielle et endovasculaire des CT au niveau de la paroi utérine pourrait être impliquée dans certaines pathologies de la grossesse telle que la prééclampsie et le retard de croissance intra-utérin (Zhou et al., 1997b).

1.2. Endomètre maternel et décidualisation

Le processus de décidualisation de l'endomètre est essentiel pour que l'implantation de l'embryon puisse se faire, un phénomène dépendant des hormones stéroïdes ovariennes, notamment de la progestérone. Une des modifications durant la décidualisation concerne les cellules stromales de l'endomètre. En effet, les cellules stromales subissent au voisinage du site d'implantation des modifications morphologiques (polygonale, cytoplasme de taille agrandie, aspect de cellules épithéloïdes) et fonctionnelles (riche en glycogène et lipide, sécrétion autocrine et/ou paracrine de prolactine (PRL), relaxine, renin, IGF et IGFBP) (Edwards et Brody 1995). Une étude *in vitro* de cellules endométriales stromales a montré que la production de PRL est probablement régulée par l'effet combiné des hormones stéroïdiennes (oestrogène et progestérone) et de la relaxine, hormone de la famille de l'insuline (Huang et al., 1987). Plus récemment, alors que la source de relaxine endogène est le corps jaune, la présence de relaxine au niveau de l'épithélium glandulaire et des cellules stromales de l'endomètre a été démontrée ainsi que son rôle autocrine/paracrine sur la sécrétion de PRL par l'endomètre *in vitro* (Bryant-Greewood et al., 1993 ; Zhu et al., 1990 ; Rosenberg et al., 1991).

1.3. Décidualisation et invasion trophoblastique

Depuis longtemps, on connaît l'importance des facteurs endométriaux dans le contrôle de l'invasion du trophoblaste: Les travaux de Kirby (1960) démontrent chez la souris que l'implantation en dehors de l'utérus est possible durant toute la période du cycle alors que, dans l'utérus, elle ne peut se faire qu'à un moment privilégié ("fenêtre d'implantation"). Il a été observé que des milieux conditionnés de cellules déciduales du premier trimestre induisent une inhibition de l'activité des gélatinases trophoblastiques (Bischof et al., 1995a). L'activité des MMP semble être contrôlée par une classe spécifique d'inhibiteur tissulaire, les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases, TIMPs). Ces TIMPs semblent être exprimés *in vitro* au niveau des cellules déciduales maternelles (Graham and Lala, 1991). Récemment, il a été suggéré que l'implantation trophoblastique dépendait de l'équilibre spatio-temporel entre les MMPs embryonnaires et les TIMPs exprimés par les cellules maternelles (Nawrocki, 1997).

La plupart de ces régulateurs de l'invasion trophoblastique sont des facteurs de croissance ou des cytokines sécrétés par un large éventail de cellules dont les cellules lymphomonocytaires, les cellules endométriales stromales, épithéliales ou les cellules trophoblastiques elle-même. Par exemple, l'IL-1 d'origine trophoblastique et endométriale inhibe la décidualisation des cellules stromales *in vitro* (Kariya et al., 1991) et stimule la production déciduale de MMP-1, -3 et -9 (Rawdanowicz et al., 1994). A l'inverse, le TGF β (transforming growth factor) semble exercer un effet anti-invasif en stimulant la sécrétion de TIMP par les CT eux-mêmes (Graham and Lala, 1991). Enfin, il a été démontré, récemment, que le LIF (Leukemia Inhibitory Factor) d'origine endométriale avait la capacité d'inhiber l'activité gélatinolytique sécrétée par le CT en inhibant certaines MMPs (Bischof et al., 1995b).

1.4. Facteurs de croissance

Les facteurs de croissance et leurs récepteurs jouent un rôle central dans le cycle cellulaire notamment en stimulant la prolifération cellulaire. Il est actuellement admis que certains facteurs de croissance tels que EGF, IGF-1 et -2 et leurs protéines de liaison, le transforming growth factor (TGF)- α et β , platelet-derived growth factor, fibroblast growth factor entre autres sont impliqués tant dans le développement

placentaire (Ohlson et al., 1989) que dans la différenciation des différents éléments endométriaux (Giudice et al., 1994) au cours du cycle et au début de la gestation. Le tableau 1 mentionne les principaux facteurs de croissance impliqués dans la grossesse de l'implantation à la parturition ainsi que leur lieu de synthèse et leur détection dans les liquides biologiques.

	Lieu de synthèse	Localisation des récepteurs	Liquides biologiques
EGF	CYT, SYN, DEC, AMN	CYT, SYN, DEC, AMN	LA
IGF-1	SYN, DEC, AMN, CHOR	SYN, CYT	SM, SC
IGF-2	SYN, DEC, AMN, CHOR	SYN, CYT	SM, SC
TGF α	CYT, SYN, DEC, AMN	CYT, SYN, DEC, AMN	SM
TGF β	SYN		
FGF	CYT		
PDGF	CYT		
IGFBP-2	CYT, SYN, DEC, AMN, CHOR		SM,LA

AMN=amnion, CHOR=chorion, CYT=cytotrophoblaste, DEC=décidue, SYN=syncytiotrophoblaste
 LA=liquide amniotique, SC=sang du cordon, SM=sérum maternel

Tableau 1 : Facteurs de croissance au niveau du placenta et des tissus intra-utérins

En outre, il faut ajouter que le placenta est un tissu extrêmement riche en récepteur pour de nombreux facteurs de croissance comme PEGF, le PDGF (Armelin et al., 1984) et l'insuline (Petruzelli 1986) ainsi que les membres de la famille de l'insuline notamment les IGF-1 (Jonas et al., 1985) et -2 (Ohlson et al., 1989). A cet égard, un nouveau gène appartenant à la famille de l'insuline a été récemment identifié.

1.5. Le gène INSL4 et son produit Early Placenta Insulin-like

Un nouveau gène dénommé insulin-like 4 (INSL4) a récemment été identifié et cloné au niveau du placenta (Chassin et al., 1995). Ce gène est exprimé préférentiellement au cours des stades précoces du développement placentaire. En effet, la stratégie expérimentale ayant conduit à la découverte du gène est basée sur la construction d'une banque d'ADNc soustraite, enrichie en séquences préférentiellement exprimées dans les cellules cytotrophoblastiques humaines prélevées à 6 semaines d'aménorrhée. Cet enrichissement est obtenu par hybridation des ADNc cibles (cellules cytotrophoblastiques jeunes) avec un excès de courts fragments d'ADNc compétiteurs (placenta à terme et lymphocytes T activés). Cette technique permet ainsi d'éliminer des transcrits codant des molécules régulatrices déjà connues de type interférons et interleukines synthétisées par les lymphocytes, ainsi que ceux codant pour les molécules communes exprimées à tous les stades de développement du placenta. La comparaison des séquences des gènes sélectionnés par ce criblage différentiel avec des séquences de gènes déjà identifiés dans les banques de données a permis de sélectionner le gène INSL4 (Chassin et al., 1994).

Le gène INSL4 est localisé sur le chromosome 9p24. Des analyses par PCR ont démontré un niveau d'expression plus important au niveau du placenta précoce par rapport au placenta à terme. D'autres tissus normaux et tumoraux ont été testés. L'expression du gène INSL4 n'a été observée que dans deux tissus, le placenta et l'utérus. La déduction de la structure primaire à partir de la séquence nucléotidique permet de mettre en évidence une conservation de la localisation de six résidus de cystéine telle qu'elles existent dans la superfamille de l'insuline, définissant une structure tertiaire semblable à toutes les molécules.

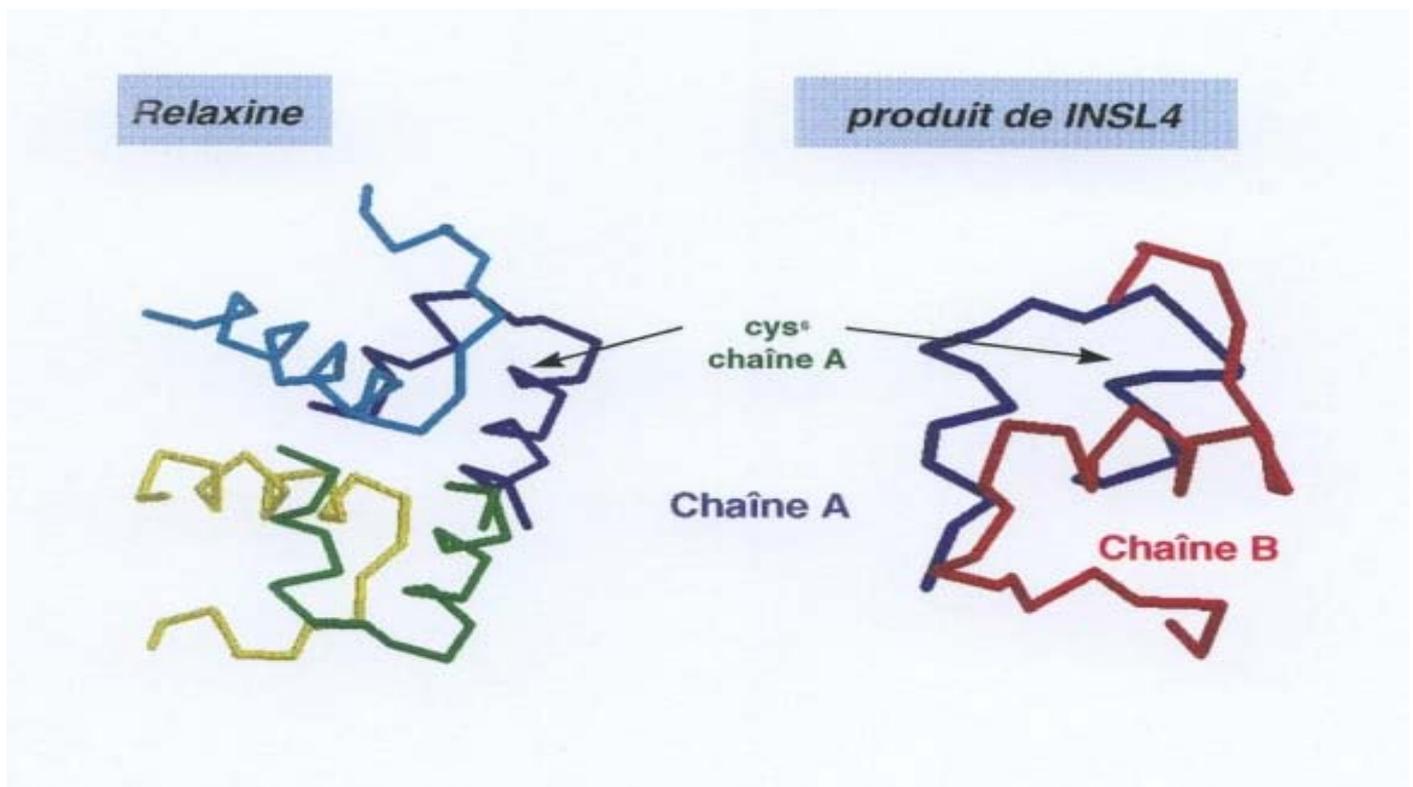


Figure 1. Comparaison des structures tridimensionnelles de la relaxine RLX-H2 (cristallisation et diffraction des rayons X) et de EPIL (modélisation moléculaire).

Chez les Mammifères, la famille des gènes liés à l'insuline (insulin-like) regroupe l'insuline, la relaxine (RLX), les facteurs de croissance insulin-like I et II (IGF-I et IGF-II) et LEY I-L, un peptide exprimé par la cellule de Leydig (LEY). Elle représente un groupe de polypeptides liés sur le plan structural dont les fonctions biologiques ont néanmoins divergées. Les préprohormones de cette superfamille comportent toutes un peptide signal, une chaîne B, un peptide C de connexion ainsi qu'une chaîne A (Le Roith D, 1997). Ces molécules subissent des étapes de maturation post-traductionnelles relativement semblables. Elles se présentent sous forme de préprohormones caractérisées par la présence d'un peptide signal, d'une chaîne B, d'un peptide C de connexion et d'une chaîne amino terminale A. La maturation de l'insuline et de la relaxine s'effectue en plusieurs étapes par clivages successifs du peptide signal puis du peptide C de connexion pour aboutir à la formation des 2 chaînes A et B associées par des ponts disulfures (Bryant-Greewood et Schwabe, 1994). En revanche, les IGF conservent le peptide C (Daughaday et Rotwein, 1989). A la jonction des domaines B et C, la protéine EPIL ne présente pas de site de clivage connu à ce jour. Le site de clivage entre les chaînes B et C est cependant bien établi pour l'insuline, moins bien pour la relaxine. En revanche, il faut noter la présence d'un site de coupure commun à ces trois molécules entre les chaînes A et C.

La protéine "Early Placenta Insulin-Like" (EPIL) correspond à la protéine putative codée par le gène INSL4. Il s'agit d'une protéine de 139 acides aminés (15,3kDa) ayant des homologies de séquence avec les membres de la superfamille des hormones liées à l'insuline (25% avec la chaîne A et B de l'insuline, 18% et 19% avec IGF-I et IGF-II respectivement, 28% avec la chaîne C de la RLX-H2) (Figures 1 et 2).

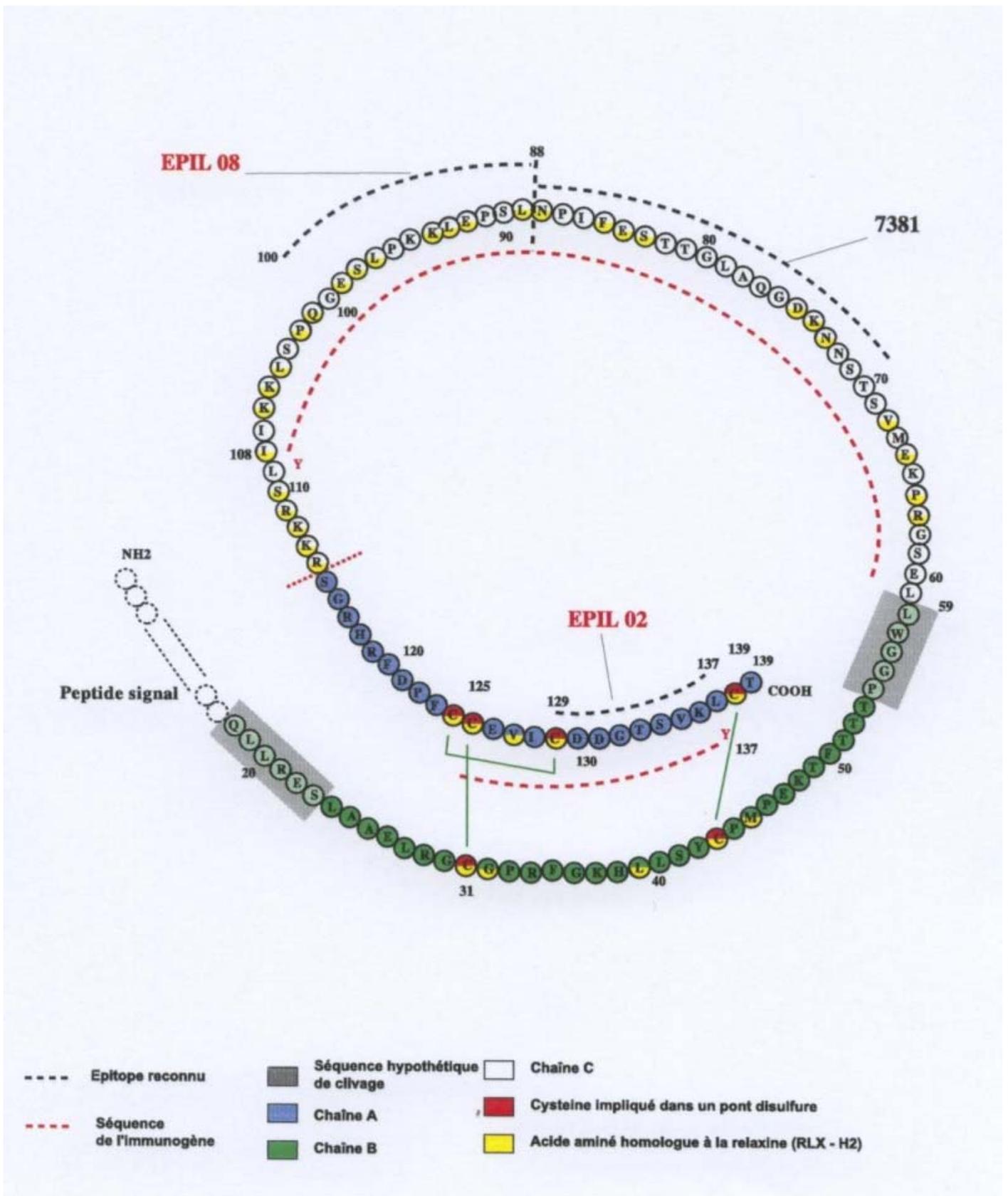


Figure 2. : Structure primaire hypothétique de la protéine préproEPIL. Localisation des peptides synthétiques immunogènes utilisés pour la reproduction des anticorps monoclonaux EPIL08 et EPIL02 ainsi que de l'anticorps polyclonal 7381.

2. BUT ET STRATEGIE DE L'ETUDE

Ce travail a porté sur la caractérisation de la protéine putative EPIL codée par le gène INSL4. Nous avons tenté de mettre en évidence la localisation de la protéine dans le placenta et l'utérus au moyen d'une technique d'immunohistochimie. D'autre part, la détection des formes moléculaires de EPIL dans divers liquides biologiques a été réalisée grâce à la construction d'un dosage immunoradiométrique.

Nous avons choisi une stratégie basée sur l'utilisation des peptides synthétiques pour produire des anticorps polyclonaux et monoclonaux dirigés contre la molécule EPIL. En effet, la connaissance de la structure d'un gène permet de déduire la structure primaire de la protéine putative codée par ce gène. Il est possible de synthétiser de courts peptides mimant des séquences peptidiques de la protéine putative. Ces peptides conjugués à des protéines porteuses constituent des immunogènes pouvant induire chez l'animal une réponse humorale. Le sérum des animaux immunisés contient alors des anticorps, appelés anti-peptides, qui sont le plus souvent, mais de façon non constante capables de reconnaître la protéine native.

Dans ce travail, deux peptides synthétisés ont permis après immunisation de lapin et souris d'obtenir des anticorps polyclonaux et monoclonaux contre les chaînes A et C. Ces anticorps ont été utilisés pour localiser la présence d'EPIL au niveau du placenta et de l'utérus par une méthode d'immunohistochimie. Simultanément, notre laboratoire a développé une méthode de dosage immunoradiométrique en utilisant deux anticorps monoclonaux anti-chaîne A et C. Divers liquides biologiques ont ainsi été testés.

3. MATERIEL ET METHODES

3.1. Production des peptides synthétiques

Les immunogènes ont été préparés de la façon suivante: Deux peptides ont été synthétisés selon une méthode en phase solide (Merrifield, 1963), à l'aide d'un synthétiseur automatique (Applied Biosystems 431A). Le peptide synthétique (PS) 59-108Y avec un résidu tyrosine additionnel dans la région carboxy-terminale mimant la quasi totalité de la chaîne C ainsi que le PS 125-137Y mimant une partie de la chaîne A sont représentés sur la figure 2.

Brièvement, le principe de la synthèse en phase solide consiste à allonger une séquence peptidique à partir d'un acide aminé lié à une résine. La procédure de synthèse débute par la fixation de l'acide aminé COOH-terminal par sa fonction carboxyl (sa fonction amine étant bloquée par le groupement protecteur Fmoc: 9Fluorenylmethoxycarbonyl) sur le support solide (billes de polystyrène). L'addition des acides aminés suivants est rendue possible par la présence d'un réactif de couplage (mélange de HoBt / HbTu) après déprotection de la fonction amine de l'acide aminé précédent par la pipéridine. Après synthèse, les peptides sont déprotégés et clivés de la résine en une seule étape par l'acide trifluoroacétique. La synthèse peptidique étant accomplie, l'identité et la pureté de chaque peptide a été vérifiée par 1) une analyse des acides aminés au moyen d'un analyseur LKB alpha, 2) une chromatographie liquidienne de haute performance (HPLC), et 3) une analyse de type micro séquençage de chaque pic obtenu sur le séquenceur de protéine automatisé (Applied Biosystems 477A). Toutes les synthèses peptidiques ont été réalisées dans le laboratoire de Microchimie (Dr. F. Troalen) de l'Institut Gustave-Roussy (Villejuif).

Afin de générer une réponse immunitaire, les peptides synthétiques, qui se comportent comme des haptènes, doivent être couplés à une protéine porteuse au moyen d'agents couplants. Ces réactifs, tels que la benzidine ou le glutaraldéhyde, permettent la liaison des peptides par leurs résidus tyrosyls. Les protéines porteuses utilisées sont l'hémocyanine de Patelle ou KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) et l'anatoxine tétanique (AT). Les peptides 59-108 (chaîne C) et 1;5-137 (chaîne A) couplé au glutaraldéhyde et à l'AT a été utilisé pour l'immunisation des souris, alors que le peptide 59-108 couplé à la benzidine et au KILH a été utilisé pour l'immunisation des lapins.

En outre, un certain nombre de peptides mimant différentes régions des deux domaines A et C d'EPIL ont été préparés: Les peptides chaîne A (115-139), et chaîne C (59-108), (59-73), (70-88), (80-98), (88-108) (Fig. 2). Des peptides analogues à la relaxineH2 (RLX) correspondant à la région 59-87 de la chaîne C d'EPIL (74-92) et (63-92) ont aussi été synthétisés et purifiés. Enfin, un peptide synthétique d'une longueur de 64 acides aminés incluant les chaînes A et C a été construit pour être utilisé comme standard pour l'étalonnage de l'immunodosage de la protéine EPIL.

3.2. Production d'anticorps polyclonaux et monoclonaux

3.2.1. Immunisation et production d'anticorps polyclonaux

Des lapins « Fauve de Bourgogne » sont immunisés par le peptide conjugué 59-108Y de la chaîne C selon le protocole présenté dans le tableau 2. Après sacrifice, le sérum des lapins est récupéré et est utilisé en dilution pour les expériences d'immunohistochimie.

Date	Injection	Prélèvements
JO	i.d : 150 µg dans ACF (50%)	Prise de sang / recherche des anticorps
JO + 21 jours	s.c : 25 µg dans AIF (50%)	
JO + 42 jours	s.c : 25 µg dans AIF (50%)	Prise de sang / recherche des anticorps
JO + 49 jours		Prise de sang/recherche des anticorps et sacrifice de l'animal si le titre est élevé

ACF : Adjuvant complet de Freud, AIF Adjuvant incomplet de Freud

s.c : sous-cutané, i.d . : intradermique

Tableau 2 : Protocole d'immunisation des lapins

3.2.2. Immunisation et production d'anticorps monoclonaux

Des souris « BALB/c » âgées de six semaines ont été immunisées avec les peptides synthétiques conjugués, soit le PS 59-108Y de la chaîne C, soit le PS 125-137Y de la chaîne A. Durant le processus d'immunisation, les séra des souris sont testés à des dilutions différentes pour la présence d'anticorps anti-peptide par ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), le peptide respectif non conjugué étant fixé sur la paroi des puits en polystyrène. Trois jours après un boost i.v~, les cellules spléniques de l'animal présentant un titre suffisant dans le sérum en anticorps dirigés contre le peptide (environ 10⁻³ par méthode ELISA) sont alors fusionnés avec des cellules de myélome NSI en utilisant du glycol de polyéthylène à 40% (Mr 1,000). Des colonies d'hybridome produisant les anticorps monoclonaux réagissant avec leur peptide respectif non conjugué par ELISA sont sélectionnés puis clonés. La

production des anticorps monoclonaux est alors terminée par une inoculation intra péritonéale des cellules d'hybridome chez des souris « nude ».

3.3. Caractérisation immunochimique des anticorps

La localisation des sites liant l'antigène de chaque anticorps a été déterminée tant pour l'immun sérum que pour les anticorps monoclonaux. Pour cela, des expériences d'inhibition par un haptène ont été réalisées. Brièvement, le choix de la dilution de l'anticorps pour ces expériences d'inhibition compétitive est déterminé à partir d'une simple courbe de titration exprimant la fixation au peptide respectif non conjugué et fixé en fonction de la dilution du sérum. La liaison de l'anticorps à son peptide synthétique respectif fixé sur un support solide est alors inhibé par des peptides correspondant de taille plus courte ou plus longue en terme d'acide aminé. Des courbes de déplacement sont alors effectuées en incubant chaque anticorps à une dilution déterminée (dilution à une concentration donnant une liaison équivalente à 50% de la liaison maximale en méthode ELISA) avec des concentrations croissantes de peptides compétiteurs. Après une incubation d'une nuit à 4°C, l'activité résiduelle anti-peptide de l'anticorps testé est mesurée par méthode ELISA.

3.4. Etude de la localisation cellulaire/tissulaire ainsi que de la détection dans les liquides biologiques de la protéine EPIL putative.

3.4.1. Immunohistochimie

Afin de localiser la présence de la protéine EPIL au niveau du placenta et de l'utérus, nous avons procédé à une analyse par immunohistochimie sur tissu inclus en paraffine. Les différents tissus évalués sont les suivants : des villosités chorales du 1^{er} trimestre de gestation (de 6 à 12 SA, n=6) provenant de produit de curetage dans le cadre d'interruption volontaire de grossesse (IVG), des cordons ombilicaux du 1^{er} (n=1), 2^{ème} (n=1) et 3^{ème} trimestre (n=1) ainsi que du tissu endométrial provenant de la décidue de produit de curetage (IVG) du 1^{er} trimestre (n=3) et d'utérus non gravide (n=6). Tous ces tissus ont été techniqués selon le même protocole avec les étapes suivantes : Fixation du tissu en moins de 15 minutes dans de l'AFA (alcool, formol, acide acétique) ou du formol 10%, puis, après moins de 24 heures, inclusion en paraffine. On procède à un déparaffinage des lames (bains de Xylène), puis hydratation à l'alcool absolu et démasquage des sites antigéniques par micro-ondes durant 15 minutes dans une solution de tampon citraté (10mM, pH 6.0). Après lavage dans une solution TBS (Dako, code S3001), les coupes sont incubées pendant 20 minutes avec l'immun sérum ou l'anticorps monoclonal anti-peptide puis lavées abondamment par la même solution TBS. La fixation de l'anticorps sur le tissu résultant de sa liaison à la protéine EPIL native est révélée un système amplificateur impliquant l'utilisation d'un anticorps secondaire biotinylé anti-Fc ayant une haute affinité pour un complexe streptavidine-phosphatase alcaline. Ainsi, on procède à l'incubation des coupes de tissu susceptibles de contenir des anticorps anti-EPIL avec des anticorps secondaires biotinylés anti-anticorps de souris et de lapin (fragment Fc de l'immunoglobuline) qui se complexent à la streptavidine-phosphatase alcaline. Enfin, on utilise une solution de chromogène qui révélera la présence du complexe associant l'anticorps primaire reconnaissant la protéine putative EPIL et l'anticorps reconnaissant le fragment Fc de l'anticorps (DAKO New Fuchsin substrate system, Carpinteria, CA). Des coupes de tissu incubées avec des anticorps non spécifiques de séra pré immuns ou avec des anticorps pré absorbés avec un excès de peptide synthétique non conjugué

spécifique correspondant ont été utilisées comme contrôle négatif L'intensité de l'immunomarquage a été arbitrairement déterminé de la façon suivante :

(-) = absence de marquage, (+)=marquage faible,

(++) = marquage modéré, (+++) = marquage intense.

3.4.2. Immunoanalyse

Un dosage immunoradiométrique de type « sandwich » a été utilisé pour détecter la présence de la protéine EPIL dans divers liquides biologiques. Ce dosage est basé sur l'utilisation de l'anticorps monoclonal anti-peptide EPIL08 comme capteur, fixé sur un support solide, et de l'anticorps monoclonal anti-peptide EPIL02 marqué à l'iode 125 comme indicateur radiomarqué. Brièvement, une incubation d'une nuit à 20°C des billes en polystyrène (Precision Plastic Ball, Chicago, MN) en présence de l'anticorps capteur dilué à 1 :500 dans une solution Pi/NaCl a permis d'obtenir une fixation de ce dernier sur les billes. Les billes recouvertes de l'anticorps capteur ont été alors incubées pendant une durée de 2 heures avec des échantillons de différent liquide biologique (ou calibrateur) dilués dans du sérum de veau. Après lavage, les molécules natives EPIL captées sur les billes par l'anticorps monoclonal EPIL08 sont révélées par l'anticorps monoclonal EPIL02 marqué au iode 125 (100,000 cpm), dilué dans une solution Pi/NaCl contenant 50% de sérum de veau foetal, et incubé pendant 1 heure à température ambiante. Après un nouveau lavage, les billes sont comptées (compteur gamma). Les liaisons non spécifiques ont été déterminées en utilisant du sérum de veau. Le peptide synthétique EPIL (76-139) correspondant à une grande partie de la chaîne A et C (Fig. 2) a été utilisée comme calibrateur à des concentrations de 5 ng/mL à 2000 ng/mL. Les différents liquides biologiques testés ont été les suivants : 1) Des échantillons de liquide amniotique prélevés par amniocentèse pour âge maternel (analyse du caryotype) ainsi que 2) les séra correspondants au cours de grossesses uniques d'un âge gestationnel allant de 12 à 34 semaines d'aménorrhée, 3) des urines de patientes présentant une grossesse d'un âge gestationnel de 8 à 22 semaines d'aménorrhée, 4) du milieu de culture prolongée de blastocystes au 5^e jour (n=6) de couples présentant un problème de stérilité et traités par fécondation in-vitro (FIV) et transfert d'embryon et enfin 5) de liquide intra folliculaire ovarien au moment de la ponction pour recueillir des ovocytes après un protocole d'hyperstimulation ovarienne contrôlée (Agoniste du GnRH, puis injection i.m. d'hormones gonadotropes de femme ménopausée ou FSH recombinante) en vue d'une FIV.

4. RESULTATS

4.1. Production et caractérisation des anticorps

4.1.1. Production et caractérisation des anticorps polyclonaux contre le peptide 59-108Y de la chaîne C

Un immunosérum anti-peptide, désigné 7381, a été produit après immunisation d'un lapin par le peptide conjugué 59-108Y de la chaîne C. La caractérisation des épitopes reconnus par cet anticorps a été effectuée par une technique ELISA. Des épreuves d'inhibition compétitive en utilisant différents peptides analogues à différentes régions de la chaîne C d'EPIL et à des régions de la chaîne C de la relaxine humaine ont démontré que l'immun sérum 7381 lie uniquement la région de

séquence en acides aminés 70-88 et qu'il ne reconnaît pas la chaîne C de la relaxine (Figure 3).

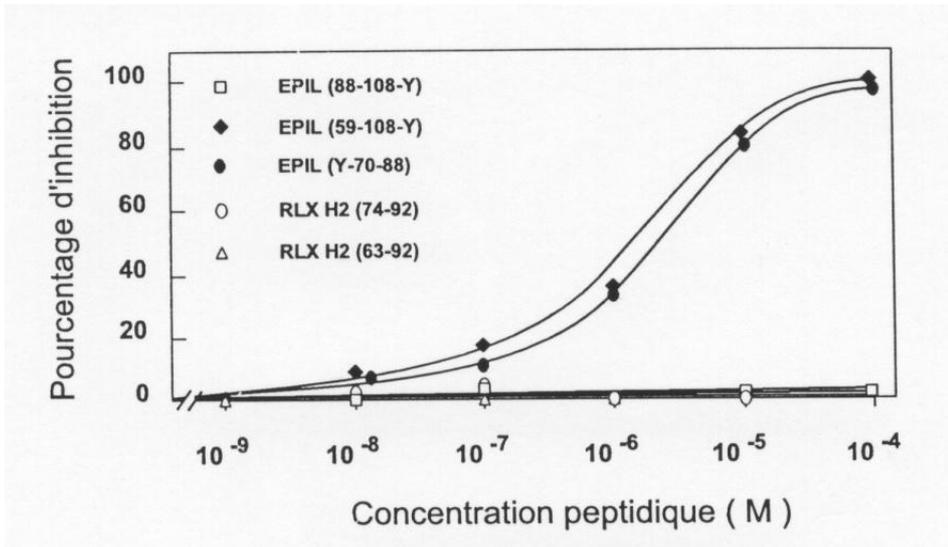


Figure 3: Courbes d'inhibition obtenues en utilisant différents peptides synthétiques de la séquence de la chaîne C de la relaxine et de la protéine EPIL avec l'anticorps polyclonal 7381.

4.1.2 *Production et caractérisation des anticorps monoclonaux dirigés contre le peptide 125-137Y de la chaîne A et contre le peptide 59-108Y de la chaîne C* Un anticorps monoclonal anti-peptide, nommé EPIL02, a été produit après immunisation de souris par le peptide conjugué 125-137Y de la chaîne A. La détermination de l'isotype a montré que EPIL02 est une immunoglobuline de type IgG2a, d'une affinité intermédiaire (2×10^{-7} L/mol). De même, un anticorps monoclonal anti-peptide IgG2a, dénommé EPIL08, a pu être généré contre le peptide conjugué 59-108Y de la chaîne C. La caractérisation des épitopes reconnus par cet anticorps a été effectuée par une technique ELISA. Des expériences d'inhibition compétitives ont démontré que l'anticorps monoclonal EPIL08 reconnaît une séquence longue de 13 résidus incluant les résidus 88-100 de la chaîne C (Figure 4).

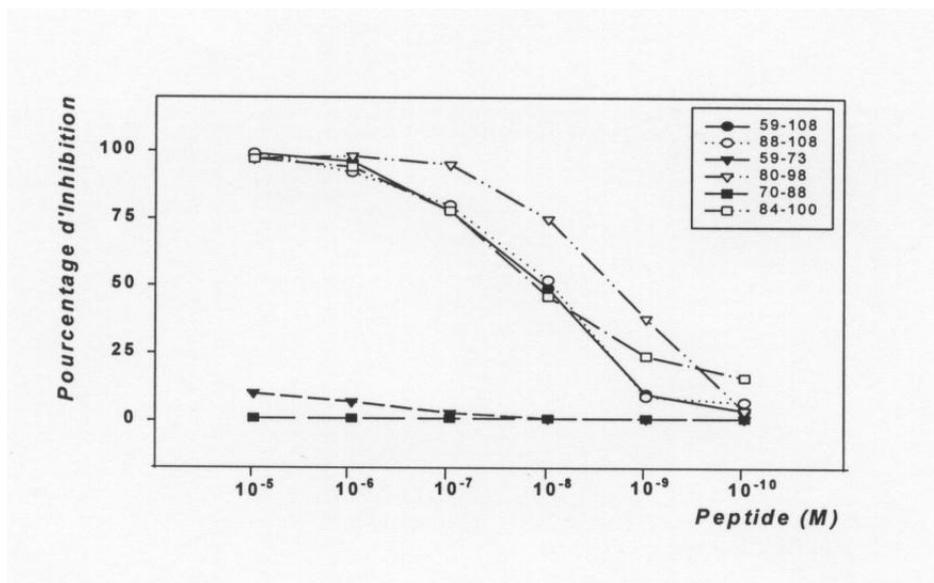


Figure 4 : Courbes d'inhibition obtenues en utilisant différents peptides synthétiques de la séquence (59-108) de la chaîne C avec l'anticorps monoclonal EPIL08.

Un immunodosage de type « sandwich » a été développé en utilisant l'anticorps monoclonal EPIL08 comme capteur et EPIL02 marqué au iode 125 comme traceur. Ce dosage a une sensibilité de 50 ng/mL pour le peptide EPIL(76-139) lorsque les étapes d'incubation sont effectuées comme décrit précédemment. La sensibilité du dosage a cependant pu être améliorée lorsque nous avons procédé à une période d'incubation en deux temps (6h + 18h) à température ambiante (Figure 5)

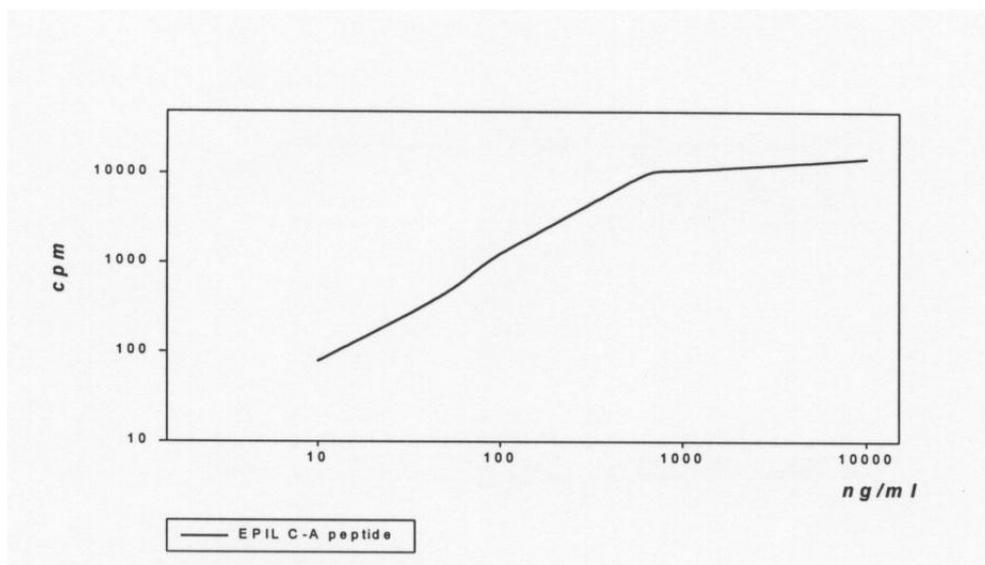


Figure 5: Elaboration d'une courbe d'étalonnage utilisant le peptide synthétique EPIL(76-139) dans l'immunodosage de type « sandwich » basé sur les anticorps monoclonaux EPIL08 comme capteur et EPIL02 marqué à l'iode 125 comme traceur.

4.2. Détection par immunohistochimie de la protéine EPIL

4.2.1. Villosités chorales et cordon ombilical.

Les résultats de l'immunomarquage au niveau des villosités chorales par les deux anticorps polyclonaux et monoclonaux anti chaîne C, 7381 et EPIL08 respectivement, et l'anticorps monoclonal anti-chaîne A, dénommé EPIL02, sont présentés dans le tableau 3.

	Anticorps polyclonal 7381 (anti-C)	Anticorps monoclonal EPIL08 (anti-C)	Anticorps monoclonal EPIL02 (anti-A)
CTV	+++	+	-
CTE	-	-	-
CT	+	++	-

CTV = cellules cytotrophoblastiques intravilleuses

CTE = cellules cytotrophoblastiques extravilleuses

ST = cellules syncytiotrophoblastiques

Tableau 3 : Détection de la protéine EPIL par immunohistochimie au niveau des villosités trophoblastiques du 1^{er} trimestre

L'immunomarquage des villosités chorales du 1^{er} trimestre (6-12 SA) par l'anticorps polyclonal 7381 à une dilution de 1 :500 permet de mettre en évidence présence spécifique de la protéine EPIL principalement au niveau du cytoplasme des cellules cytotrophoblastiques intravillositaires (Fig. 6A, B et E) ainsi qu'au niveau des cellules mésenchymateuses péri endothéliales des vaisseaux intravillositaires (Fig. 6B et E), alors que les cellules syncytiotrophoblastiques apparaissent peu marquée. Les cellules cytotrophoblastiques extravilleuses (« shell ») ou des colonnes des villosités crampons ne présentent aucun marquage spécifique.

En utilisant l'anticorps monoclonal EPIL 08 (1 :500), reconnaissant un épitope sur la chaîne C différent de celui de l'anticorps polyclonal 7381 (Cf. caractérisation des anticorps), l'unique élément cellulaire marqué intensément est le cytoplasme du syncytiotrophoblaste (Fig. 6C). Il faut noter que cet immunomarquage est hétérogène avec, sur certaines régions des coupes de tissu, des plages de cellules cytotrophoblastiques marquées mimant l'immunomarquage de l'anticorps polyclonal 73 8 1.

A l'instar de l'immunomarquage des cellules mésenchymateuses péri endothéliales des vaisseaux intravillositaires, l'immunomarquage de cordons ombilicaux du 1^{er}, 2^{ème} et 3^{ème} trimestre par l'anticorps polyclonal 7381 permet de mettre en

évidence la présence de la protéine EPIL au niveau des cellules musculaires lisses de la paroi des vaisseaux artériel et veineux en particulier durant le 1er trimestre (Fig. 7A et C). De plus, on observe un marquage de l'amnios qui semble persister pendant toute la période de gestation (Fig. 7B). L'immunomarquage par l'anticorps monoclonal EPIL 08 confirme la présence d'EPIL au niveau de l'amnios avec une intensité décroissante du terme vers le 1er trimestre. En revanche, il n'y a aucun marquage des cellules mésenchymateuses musculaires lisses constituant les vaisseaux du cordon ombilical.

4.2.2. Utérus, endomètre et décidue

L'immunomarquage de tissus endométriaux par l'immun sérum 7381 et l'anticorps monoclonal EPIL 08 permettent de mettre en évidence la protéine EPIL au niveau de l'épithélium glandulaire (Fig. 8A et B) et luminal au niveau de l'utérus gravide du 1er trimestre (9 SA, n=3) ainsi que de l'utérus non gravide (Fig. 8C). Une pré incubation de l'immun sérum 7381 et l'anticorps monoclonal EPIL 08 avec le peptide immunogène (59-108Y) permet d'inhiber le marquage. De plus, on note un marquage discret à modéré des cellules stromales décidualisées hétérogènes avec, parfois, un marquage prédominant au niveau nucléaire.

L'immunomarquage de tissu utérin non gravide (n=5) est présenté sur le tableau 4.

	Anticorps polyclonal (anti-C) 7381	Anticorps monoclonal EPIL08 (anti-C)	Anticorps monoclonal EPIL02 (anti-A)
Utérus gravide			
épith. glandulaire	++	++	-
stroma	-	-	-
Utérus non gravide			
épith. glandulaire	++	++	-
stroma	++	+	-

Contrôle négatif. inhibition par les peptides synthétiques respectifs immunogènes

Tableau 4 : Détection par immunohistochimie de la protéine EPIL au niveau de l'endomètre d'un utérus gravide du 1er trimestre de grossesse et de l'endomètre au cours du cycle menstruel.

Selon des critères anatomo-pathologiques classiques les tissus utérins ont été classés en deux catégories A et B : les endomètres en phase proliférative (A, n=3) et en phase sécrétoire (B, n=3). L'anticorps monoclonal EPIL 08 a permis de détecter spécifiquement la présence de la protéine EPIL au niveau de l'épithélium de l'endomètre. Le chorion cytogène des phases prolifératives et sécrétoires ne présente aucun immunomarquage avec les anticorps EPIL 08 et 7381. En outre, il n'existe pas de différence d'immunomarquage entre ces deux anticorps en terme de localisation cellulaire et d'intensité entre l'endomètre de la phase proliférative et sécrétoire. Enfin, l'immunomarquage par l'anticorps EPIL 08 a permis de mettre en évidence la présence de la protéine EPIL de façon prépondérante au niveau de l'épithélium luminal de l'endomètre par rapport à l'épithélium glandulaire indépendamment de la période du cycle menstruel (dans 4 cas sur 6).

4.3. Détection par immunoanalyse de la molécule EPIL dans les liquides biologiques

4.3.1. Construction du dosage radio métrique

Un dosage immunoradiométrique de type « sandwich » a été développé en utilisant EPIL08, comme anticorps capteur, et EPIL02, marqué à l'iode 125, comme anticorps traceur. Ce test a une sensibilité de 50 ng/ml. Une amélioration de sa sensibilité est obtenue en prolongeant les étapes d'incubation (6 heures et 18 heures à température ambiante). Dans ce cas, la sensibilité du dosage est voisine de 10 ng/ml.

4.3.2. Dosage des formes moléculaires de la protéine EPIL dans les liquides biologiques

Le dosage EPIL08-EPIL02 a été utilisé pour mettre en évidence la présence de la protéine EPIL dans le liquide amniotique durant la grossesse (n=33) à différentes périodes de gestation (12 à 34 semaines d'aménorrhée). Les résultats montrent que les concentrations varient de 20 et 1000 ng/mL. La figure 6 représente les concentrations d'EPIL obtenues par immunodosage dans le liquide amniotique ainsi que dans le sérum au cours de la grossesse. Le dosage de la protéine EPIL (chaîne A et C) dans le sérum en cours de grossesse n'a permis de détecter que des concentrations faibles (12 à 101 ng/ml) de la molécule, à la limite du seuil de sensibilité.

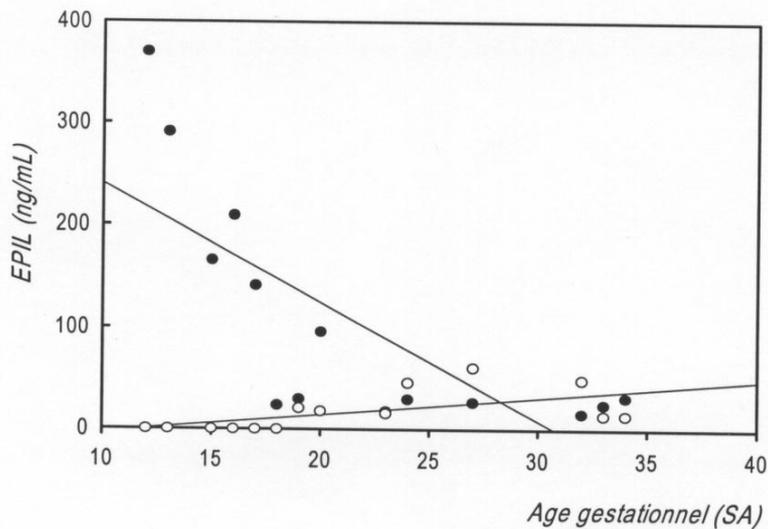


Figure 6: Concentrations de la protéine EPIL dans le liquide amniotique (*) et dans le sérum (°) obtenues par un immunodosage de type « sandwich » avec deux anticorps monoclonaux EPIL08 et EPIL02

En revanche, les autres liquides biologiques notamment les urines de patientes enceintes ainsi que les liquides folliculaire~ recueillis au cours de ponctions dans le cadre de FIV/TE après hyperstimulation contrôlée ovarienne ainsi que des milieux de culture de blastocyste (5` j) ne semblent pas contenir la protéine EPIL. Toutefois, la faible sensibilité du dosage actuel ne permet pas de conclure de façon définitive quant à la présence ou l'absence d'EPIL dans ces liquides biologiques.

5. DISCUSSION

De nombreux travaux visant à la caractérisation de molécules impliquées dans le processus de l'implantation et/ou du développement placentaire utilisent les modèles animaux notamment murins (Cross et al., 1994). Cependant, bien que l'on ait jamais pu observer les différentes phases d'implantation in vivo chez l'homme, des études in vitro montrent que les mécanismes d'implantation sont différents des autres espèces (Enders and Schlafke, 1972) faisant de l'implantation humaine un phénomène unique (Linder, 1972).

Depuis environ 10 ans, de nombreux facteurs de croissance notamment de la famille de l'insuline comme les IGFs, mais aussi FEGF, le TGF(x entre autres ainsi que leurs récepteurs ont été retrouvés au niveau du placenta (Jonas and Harrison, 1985 ; Chen et al., 1988). Récemment, l'hormone de croissance placentaire codée par le gène GH-V pourrait être impliqué dans le développement placentaire par des mécanismes para- et

autocriniens (Alsat et al., 1997). Des auteurs ont démontré de plus que certains protooncogènes tels que *sis* et *myc* et facteurs de croissance comme l'IGF-2 impliqués dans le contrôle de la croissance cellulaire jouent un rôle important dans le contrôle de la croissance placentaire avec une boucle de régulation autocrine (Goustin et al., 1985 ; Ohlson et al., 1989) et probablement des phénomènes d'invasion au niveau de l'endomètre. Aussi, le trophoblaste peut être considéré comme un tissu pseudo malin.

Grâce à une stratégie basée sur une méthode d'hybridation soustractive notre laboratoire, en 1994, a cloné un gène préférentiellement exprimé dans le placenta, à un stade précoce de son développement (Chassin, et al., 1994). Ce gène, dénommé INSL4, code pour une protéine, appelée Early Placenta Insulin-Like (EPIL), appartenant à la superfamille des molécules apparentées à l'insuline, une famille de facteurs de croissance. L'objectif du présent travail s'inscrit dans un des axes de recherche portant sur ce nouveau gène, à savoir l'étude de l'expression de la protéine EPIL au niveau du placenta et de l'utérus.

Nous avons élaboré une stratégie basée sur une approche immunologique avec pour objectifs 1/ de produire des anticorps monoclonaux et polyclonaux spécifiques dirigés contre des peptides synthétiques mimant des régions de la molécule EPIL, puis 2/ d'utiliser ces outils pour la caractérisation de la protéine produite in vivo dans les deux seuls tissus exprimant le gène INSL4 soit le placenta et l'utérus, et 3/ mettre au point un dosage de façon à détecter EPIL dans les liquides biologiques.

Deux anticorps produits contre le peptide 59-108Y mimant la chaîne C, respectivement l'immun sérum 7381 et l'anticorps monoclonal EPIL08 ont permis de mettre en évidence la protéine EPIL au niveau des différents tissus analysés par immunohistochimie. Alors que ces deux anticorps sont dirigés contre la chaîne C, deux immunomarquages très différents ont été obtenus au niveau de coupes de villosité chorale. L'immun sérum 7381 permettait de révéler la présence de la protéine au niveau du cytotrophoblaste villositaire ainsi qu'au niveau de la paroi des vaisseaux intravillositaires, alors que l'anticorps monoclonal EPIL08 ne marquait que le syncytiotrophoblaste. Cette très nette différence d'immunomarquage entre l'immun sérum 7381 et l'anticorps monoclonal EPIL08 au niveau des éléments de la villosité chorale se confirme au niveau de tissu comme le cordon ombilical notamment en ce qui concerne le marquage vasculaire. En effet, les muscles lisses de la paroi des vaisseaux du cordon ombilical du 1er trimestre seulement sont immunomarqués uniquement par l'immun sérum 7381.

L'ensemble de ces premiers résultats amènent à faire différents commentaires. Au préalable, il faut rappeler que des épreuves d'inhibition ont démontré que les épitopes reconnus par l'immun

sérum 7381 et l'anticorps monoclonal EPIL08 sont différents correspondant respectivement aux résidus 59-88 et 88-100 de la chaîne C. Aussi, bien que les anticorps polyclonaux soient moins spécifiques en raison de l'éventail large d'isotype d'immunoglobuline, cette discordance d'immunomarquage pourrait être expliquée par la détection de deux conformations ou formes moléculaires différentes de la protéine EPIL. Il est intéressant de noter à cet égard que l'immunomarquage au niveau de l'amnios ainsi qu'au niveau de l'endomètre décidualisé ou non n'est pas différent entre l'immun sérum et l'anticorps monoclonal anti-chaîne C. En effet, nous avons mis en évidence la présence de la protéine EPIL au niveau de l'épithélium luminal et glandulaire de l'endomètre décidualisé et de l'endomètre au cours du cycle menstruel en utilisant les deux types d'anticorps, respectivement l'immun sérum 7381 et l'anticorps monoclonal EPIL08.

L'utilisation de l'anticorps monoclonal EPIL02, produit contre le peptide conjugué 125-137 mimant la chaîne A, n'a jamais permis de détecter la présence d'EPIL tant au niveau du placenta, du cordon ombilical qu'au niveau de l'utérus. Ces résultats indiquent que l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal EPIL02, dirigé contre la région 125-137 de la chaîne A est inaccessible au niveau de la protéine native ou que l'anticorps possède une trop faible affinité. De plus, l'analyse de la structure tridimensionnelle de l'insuline obtenue par cristallographie, ainsi que celles des IGF et de la relaxine obtenues par modélisation moléculaire (Bedarkar et al., 1977, Blundell et al., 1978) permet de prédire que la région EPIL-A (125-137) pourrait être en contact étroit avec la chaîne B, masquant ainsi l'épitope reconnu par le mAb EPIL02. Cette observation n'a rien d'exceptionnel. En effet, il est connu que les anticorps anti-peptides reconnaissant des structures contiguës (épitopes linéaires) peuvent être enfouis ou partiellement accessibles à la liaison de l'anticorps sur la protéine native (Bidart et al., 1993).

Si l'anticorps monoclonal EPIL02 n'a pas permis de détecter la protéine native EPIL par immunohistochimie, son utilisation comme capteur, marqué à l'iode 125, associée à l'anticorps monoclonal EPIL08 dans un immunodosage de type sandwich a permis de mettre en évidence la protéine EPIL (chaîne A et C) au sein de liquide amniotique au cours de la grossesse chez la femme. Sa présence dans le liquide amniotique n'est pas étonnante au vu des différents éléments immunomarqués notamment l'amnios. En effet, l'amnios au niveau des membranes fœtales représente le système de communication entre le fœtus et la décidue maternelle.

En ce qui concerne la détection de la protéine EPIL au niveau du sérum de patientes enceintes, les concentrations sont relativement faibles par rapport aux concentrations détectées par cette même méthode radio immunométrique anti-A et-C dans le liquide amniotique (entre 10 et 100 ng/mL vs 10 et 1000 ng/mL,

respectivement). Plusieurs explications peuvent être apportées. D'abord, lorsque l'on considère les concentrations d'une protéine comme la relaxine, on constate que les taux au cours de la grossesse sont aussi très faibles entre 0.5 et 0.8 ng/mL (Bryant-Greenwood et al., 1994). En outre, même si notre immunodosage n'est pas sensible avec un seuil à 10 ng/mL, peu de dosage radioimmunométrique ont pu être proposés pour des molécules comme celles de la famille de l'insuline d'aussi faibles poids moléculaire. En effet, nos anticorps ont été générés à partir de peptides synthétiques rarement identiques à la conformation de la protéine native (conformations aléatoires) expliquant aussi la faible sensibilité de notre immunodosage. Toutefois, les données obtenues au niveau du liquide amniotique et du sérum permettent de postuler que les régions reconnues par les deux anticorps monoclonaux soit 125-137 de la chaîne A et 88-100 de la chaîne C.

L'ensemble de ces résultats démontre pour la première fois la présence de la protéine EPIL immunoréactive au niveau du trophoblaste, de la décidue ainsi que de l'endomètre au cours du cycle à l'instar d'autres facteurs de croissance. De plus, la présence de régions de la chaîne C de la protéine EPIL dans les tissus placentaires et utérins ainsi que dans les liquides biologiques soulève l'hypothèse d'une absence de processus de maturation intracytoplasmique sans clivage du peptide C de connexion. En effet, l'insuline ainsi que la relaxine sont maturées et biologiquement active sous la forme A-B possédant deux sites furine au niveau de la chaîne C-A et B-C. En ce qui concerne la protéine pro EPIL, il n'y a pas de séquences consensus connus à ce jour pour une protéase entre la chaîne B et C. Ainsi, la question de savoir si la protéine EPIL est maturée ou non pour être biologiquement active reste posée. D'ailleurs, il est intéressant de relever que des auteurs ont démontré, récemment, l'activité biologique d'une pro relaxine recombinante porcine produite par des cellules CHO (Vu et al., 1993).

Il est certain que des études ultérieures sont encore nécessaires pour identifier la nature exacte de la protéine EPIL au niveau des différents tissus.

En conclusion, nous avons démontré dans la présente étude que la protéine EPIL, produit du gène INSL4 et membre de la famille de l'insuline, est exprimée au niveau tissulaire (placenta et utérus) et probablement sécrétée (liquide amniotique) sous une forme moléculaire pro EPIL conservant son peptide C de connexion.

6. BIBLIOGRAPHIE

- Armelin, M.C.S., Kelly, A.K., Stewart, T.A., Leder, P., Cochran, B.H., Stiles, C.F. (1984) A functional rôle for c-myc in the mitogenic response to platelet-derived growth factor. *Nature* 310, 655-660.
- Bedarkar, S., Turnell, L.W. and Blundell, T. (1977) Relaxin has conformational homology with insulin. *Nature* 270, 449-451.
- Bidart, J.-M. (1993) Functional mapping of proteins with monoclonal antibodies. *Immunotechnology* 77-89.
- Bischof, P., Haenggeli, L., and Campana, A. (1995b) Effect of leukemia inhibitory factor on human cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway. *Am. J. Reprod. Immunol.* 34, 225-230.
- Bischof, P., Martelli, M. (1992) Proteolysis in the penetration phase of the implantation process. *Placenta.* 13, 17-24.
- Bischof, P., Martelli, M., Campana, A., Itoh, Y., Ogata, Y. and Naganase, H. (1995a) Importance of metalloproteinases (MMP) in human trophoblast invasion. *Early Pregn. Biol. Med.* 1, 263-269.
- Blundell, T.L., Bedarkar, S., Rinderknecht, E. and Humbel, R.E. (1978) Insulin-like growth factor: A model for tertiary structure accounting for immunoreactivity and receptor binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 180-184.
- Bryant-Greenwood, G.D, Rutanen, E.M., Partanen, S., Coelho, T.K., and Yamamoto, S.Y. (1993) Sequential appearance of relaxin, prolactin and IGFBP-1 during growth and differentiation of the human endometrium. *Mol. Cell. Endocrinol.* 95, 23-29.
- Bryant-Greenwood, G.D. and Schwabe, C. (1994) Human relaxins: Chemistry and Biology. *Endocrine Rev.* 15, 5-26.
- Chassin, D., Bénifla, J.-L., Delattre, Cl. et al. (1994) Identification of genes overexpressed in tumors through preferential expression screening in trophoblasts. *Cancer Res.* 54, 5217-5223.
- Chassin, D., Laurent, A., Janneau, J.L., Berger, R., Bellet, D. (1995) Cloning a new member of the insulin gene superfamily (INSL4) expressed in human placenta. *Genomics.* 29, 465-470.
- Chen, C.F., Kurachi, H., Fujida, Y. et al. (1988) Changes in epidermal growth factor receptor and its messenger ribonucleic acid levels in human placenta and isolated trophoblast cells during pregnancy. *J Clin. Endocrinol. Métab.* 67, 1171-1177.
- Cross, J.C., Werb, Z. and Fisher, S.J. (1994) Implantation and the placenta: Key pieces of the development puzzle. *Science* 266, 1508-1518.
- Daughaday, W.H. and Rotwein, P. (1989) Insulin-like growth factors 1 and 2. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocrine Rev.* 10, 68-91.
- Edwards, R.G. and Brody, S.A. (1995) Principles and practice of assisted human reproduction. *WB Saunders.* 581-584.

- Enders, A.C. and Schlafke, S. (1972) Implantation in the ferret: Epithelial penetration. *Am. J Anat.* 133, 291-316.
- Fisher, S.J., Leitch, M.S., Kantor, M.S. et al. (1985) Degradation of extracellular matrix by the trophoblastic cells of first trimester placenta *J Cell. Biochem.* 27, 31-41.
- Giudice, L.C. (1994) Growth factors and growth modulators in human uterine endometrium : their potential relevance to reproductive medicine. *Fertil. Steril.* 61, 1-17.
- Goustin, A.S., Betsholtz, C., Pfeifer-Ohlsson, S. et al (1985) Coexpression of the sis and myc proto-oncogenes in developing human placenta suggests autocrine control of trophoblast growth. *Cell* 41, 301-312.
- Graham, C.H. and Lala, P.K. (1991) Mechanism of control of trophoblast invasion in situ. *J Cell Physiol.* 148, 228-234.
- Huang, J.R., Tseng, L., Bishof, P., Janne, O.A. (1987) Regulation of prolactin production by progesterin, estrogen and relaxin in human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 126, 2011-2017.
- Jonas, H.A., Harrison, L.C. (1985) The human placenta contains two distinct binding and immunoreactive species of insulin-like growth factor-1 receptors. *J Biol. Chem.* 260, 2288-2294.
- Kariya, M., Kanzaki, H. Takakura, K. et al. Interleukine 1 inhibits in vitro decidualisation of human endometrial stromal cells. *J Clin. Endocrinol. Métab.* 73, 1170-1174.
- Kaufmann, P., Castellucci, M. (1997) Extravillous trophoblast in the human placenta. A Review. *Trophoblast Research* 10, 21-65.
- Le Roith, D. (1997) Insulin-like growth factors. *N. Engl. J Med.* 336, 633-640.
- Librach, C.L., Werb, Z., Fitzgerald, M.L. et al. (1991) 92-KD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. *J Cell. Biol.* 113, 437-449.
- Linder, H.R. (1972) Choice of an animal model for the study of ovum implantation *Acta. Endocrinol.* 93-99.
- Nawrocki, B., Polette, M., Maquoi, E. and Birembaut, Ph. (1997) Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during human placental development. *Trophoblast Research* 10, 97-113.
- Ohlson, R., Hohngren, I., Glaser, A., Szpecht, A., Pfeifer-Ohlson, S. (1989) Insulin-like growth factor 2 and short-range stimulatory loops in control of human placental growth. *EMBO* 8, 1993-1999.
- Petraglia, F., Florio, P., Nappi, C. and Genezzani, A.R. (1996) Peptide signaling in human placenta and membranes : Autocrine, paracrine, and endocrine mechanisms. *Endocrine Reviews* 17, 156-186.
- Petruzzelli, L., Herrera, R., Rosen, O.M. (1984) Insulin receptor is an insulin-dependent tyrosine protein kinase : copurification of insulin-binding activity and protein kinase activity to homogeneity from human placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 3327-3321.

Rawdanowicz, T.J., Hampton, A.L., Nagase, H., Wooley, D.E. and Salamonsen, LA (1994) Matrix metalloproteinase production by cultured human endometrial stromal cells : identification of interstitial collagenase, gelatinase-A, gelatinase-B, and stromelysin-1 and their différential regulation by interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor-alpha. *J Clin. Endocrinol. Métab.* 79, 530-536.

Rosenberg, M., Mazella, J., Tseng, L. (1991) Relative potency of relaxin, insulin-like growth factors, and insulin on the prolactin production in progestin-primed human endometrial stromal cells in long-term culture. *Ann. N. Y Acad. Sei.* 622, 138-144.

Sappino, A.P., Huarte, J., Belin, D. and Vassali, J.D. (1989) Plasminogen activator in tissue remodeling and invasion: mRNA localization in mouse ovaries and implanting embryos. *J Cell. Biol* 109, 2471-2479.

Vu, A.L., Green, C.B., Roby, K.F., Soares, M.J., Fei, D.T., Chen, A.B., and Kwok, S.C. (1993) Recombinant porcine prorelaxin produced in Chinese hamster ovary cells is biologically active. *Life Sci.* 52, 1055-1061.

Zhou, Y., Damsky, C.H. and Fisher, S.J.(1997b) Preeclampsia is associated with failure of cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype : one cause of defective endovascular invasion in this syndrome ? *J Clin. Invest.* 99, 2152-2164.

Damsky, C.H. (1997a) Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they différentiate. A strategy for successful endovascular invasion ? *J Clin. Invest.* 99, 2139-2151.

Zhu, H.H., Huang, J.R., Mazella, J., Rosenberg, M., Tseng, L. (1990) Différential effects of progestin and relaxin on the synthesis and secretion of immunoreactive prolactin in the long term culture of human endometrial stromal cells. *J Cl. Endocrinol Métab.* 71 : 889-889