

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉTUDE DE L'EFFET D'UN ANTAGONISTE SE LIANT AU RÉCEPTEUR À LA
PTHRP (PTH1R) SUR LES NIVEAUX D'EXPRESSION D'ARN_m DE
PROTÉINES INTERVENANT DANS LE TRANSPORT DE CALCIUM VIA LE
PLACENTA HUMAIN

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
MATHILDE RIOLS
JUN 2008

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Ce mémoire est le fruit du travail d'une expérience de vie que je conclue aujourd'hui, et qui n'aurait jamais pu aboutir sans l'aide de certaines personnes :

Merci au Docteur Julie Lafond, sans qui ma maîtrise n'aurait pu voir le jour,

À Maude Ethier-Chiasson, toi qui a su si bien me soutenir durant ces expériences, essuyer mes larmes dans les temps difficiles et qui est la source infinie de tous ces bons souvenirs...

À Frédérique Le Bellego, qui a eu l'extrême patience de répondre à toutes mes questions, de me guider dans mes réflexions, et d'avoir été d'une compagnie précieuse et délicieuse...

À Marc Amyot et Ariane Gravel, qui m'ont si bien accueillie et grâce à qui, cette première année québécoise sera un souvenir inoubliable...

Merci à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à l'aboutissement de ce projet !

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	v
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
RÉSUMÉ	xii
INTRODUCTION.....	1
1 CHAPITRE I : ÉTATS DES CONNAISSANCES	3
1.1 LE PLACENTA HUMAIN ET SA COMPOSITION	3
1.1.1 Caractéristiques générales.....	3
1.1.2 De la fécondation à la nidation.....	4
1.1.3 La cellule syncytiotrophoblastique.....	6
1.1.4 Les membranes syncytiotrophoblastiques	7
1.2 LE TRANSPORT PLACENTAIRE	8
1.2.1 Caractéristiques du transport placentaire.....	8
1.2.2 Le transport du Ca ²⁺	9
1.3 LES HORMONES HYPERCALCÉMIANTES.....	11
1.3.1 L'hormone parathyroïdienne (PTH).....	11
1.3.2 Le peptide apparenté à la parathormone (PTHrP).....	15
1.4 RÉCEPTEURS AUX HORMONES HYPERCALCÉMIANTES	20
1.4.1 Le récepteur à la PTH/PTHrP de type 1 : PTH1R	21
1.4.2 Le récepteur à la PTH/PTHrP de type 2 : PTH2R	27
1.4.3 Le récepteur à la PTH/PTHrP de type 3 : PTH3R	29
1.5 LES PROTÉINES CALCIQUES.....	30
1.5.1 Les canaux TRPV5 et TRPV6	30
1.5.2 Les protéines de liaison du calcium.....	32
1.5.3 La « Plasma Membrane Calcium ATPase »: PMCA	34

1.5.4	L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$: NCX.....	36
1.6	BUTS DU PROJET.....	39
1.7	HYPOTHÈSES DE TRAVAIL.....	40
2	CHAPITRE 2 : ARTICLE SCIENTIFIQUE.....	41
2.1	CONTRIBUTIONS.....	41
2.2	ARTICLE SCIENTIFIQUE.....	42
	INFLUENCE OF THE PTH/PTH _{RP} RECEPTOR (PTH _{1R}) ANTAGONIST: PTH (7-34) ON THE LEVEL OF mRNA EXPRESSION OF PROTEINS INVOLVED IN CALCIUM TRANSPORT TRANSPLACENTAL.....	42
	ABSTRACT.....	43
	INTRODUCTION.....	44
	MATERIALS AND METHODS.....	49
	RESULTS.....	52
	DISCUSSION.....	55
	REFERENCES.....	60
3	CHAPITRE III.....	76
	CONCLUSION ET DISCUSSION.....	76
4	CHAPITRE IV.....	80
	BIBLIOGRAPHIE.....	80

LISTE DES FIGURES

- Figure 1-1** : Diagramme d'un foetus à terme *in utero* incluant une vue du placenta. Tiré de Gray, H., Bannister, L.H. Berry, M.M. Williams, P.L., 1995..... 4
- Figure 1-2** : Diagramme de l'organisation des tissus placentaires. Tiré de Gray, H., Bannister, L.H. Berry, M.M. Williams, P.L., 1995..... 6
- Figure 1-3** : Représentation schématique des trois isoformes initiales de la PTHrP issues de l'épissage alternatif de l'ARN pré-messager. Les modifications post traductionnelles consistant en une endoprotéolyse au niveau des sites multi-basiques génèrent les formes matures de sécrétion N-terminale, intermédiaire et C-terminale de la PTHrP. Les principales fonctions physiologiques connues de ces formes matures sont précisées. NLS signifie séquence de localisation nucléaire. Tiré de Clemens, T.L., et *al.*, 200118
- Figure 1-4** : Représentation schématique du PTH1R. La séquence en acides aminés est montrée avec la localisation des domaines transmembranaires. La large boucle N-terminale est représentée au haut du diagramme. Le triangle inversé indique le site de clivage pour la séquence signal de 23 acides aminés. Les cercles noirs représentent les sites de N-glycosylation. Tiré de Gensure, R.C., T.J. Gardella, and H. Juppner, 2005.21
- Figure 1-5** : Signalisation du récepteur PTH/PTHrP (PTH1R). Le récepteur commun de la PTH et du PTHrP active deux types de signaux intracellulaires liés aux protéines Gs et Gq, nécessaires pour la différenciation ostéoblastique. Une administration prolongée de PTH rétrocontrôle la voie Gq et bloque la

différenciation. Une stimulation prolongée de l'adénylate cyclase est présente dans la dysplasie fibreuse des os par mutation activatrice de la protéine Gs. (PTH : parathormone, PTHrP : PTH related peptide, AC : adénylate cyclase, PKA : protéine kinase A, PKC : protéine kinase C, PLC : phospholipase C, DAG : diacylglycérol, IP3 : inositol trisphosphate). Tiré de Gennero, I., *et al.*, 2004.....26

Figure 1-6 : Structure primaire du récepteur PTH2 humain. Le PTH2R est composé de sept hélices transmembranaires (TM 1 à TM 7). Les cercles noirs représentent les acides aminés conservés par rapport à la séquence du PTH1R de l'opossum. Sont également représentés en cercles jaunes, les résidus non conservés entre les PTH1R et les PTH2R. Les cercles gris représentent les acides aminés mutés dans les expériences de Turner *et al.* D'après Turner *et al.*, 1998.28

Figure 1-7 : Représentation schématique de protéines intervenant dans le transport calcique au travers d'un syncytiotrophoblaste.30

Figure 2-1 : Kinetics of Ca²⁺ uptake by JEG-3 cells after treatment with PTH (7-34)68

Figure 2-2 : Relative expression of the TRPV6 mRNA in JEG-3 according to PTH (7-34) concentration.....69

Figure 2-3 : Relative expression of the TCTP mRNA in JEG-3 according to PTH (7-34) concentration70

Figure 2-4 : Relative expression of the PMCA1 mRNA in JEG-3 according to PTH (7-34) concentration.....71

Figure 2-5 : Relative expression of the PMCA4 mRNA in JEG-3 according to PTH (7-34) concentration.....	72
Figure 2-6 : Relative expression of the NCX1 mRNA in JEG-3 according to PTH (7-34) concentration.....	73
Figure 2-7 : Relative expression of the NCX2 mRNA in JEG-3 according to PTH (7-34) concentration.....	74
Figure 2-8 : Relative expression of the NCX3 mRNA in JEG-3 according to PTH (7-34) concentration.....	75

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1-1 : Effets sélectifs des différentes molécules de la PTH [73].....	14
Table 2-1 : Oligonucleotide primers used in real time PCR	65
Table 2-2 : Initial velocity and plateau of Ca ²⁺ uptake by trophoblasts according to day of culture.....	65

LISTE DES ABRÉVIATIONS

μCi	Microcurie
μl	Microlitre
μm	Micromole
1,25(OH) ₂ D ₃	Vitamine D ₃
AC	Adénylate cyclase
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
AP-1	Protéine activatrice 1
AP-2	Protéine activatrice 2
Arg	Arginine
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
β -ARK	« Béta Apaf-1 related killer »
BBM	Membrane en bordure en brosse
BPM	Membrane basale plasmique
Ca ²⁺	Calcium
CaBP	« Calcium binding protein » (protéine de liaison du calcium)
ADNc	ADN complémentaire
CT	Calcitonine
DAG	Diacylglycérol
DHP	Récepteur de la dihydropyridine
Dss4	« Dominant suppressor of sec4-8 »
EGF	« Epidermal growth factor »
g	Gramme
G6PDH	D-glucose-6-phosphatedehydrogenase

GC	Guanine-Cytosine
GRK	« G protein-coupled receptor kinase » (kinases spécifiques des récepteurs couplés aux protéines G)
h	Heure
hCG	« Human chorionic gonadotropin » (hormone chorionique gonadotrope humaine)
hPL	« Human placental lactogen » (lactogène placentaire humain)
IP3	Inositol 1,4,5-trisphosphate
K ⁺	Potassium
Kb	Kilobase
Kg	Kilogramme
Leu	Leucine
Lys	Lysine
M	Molaire
Maz	Protéine en doigt de zinc associée à Myc
mg	Milligramme
min	Minute
mM	Millimolaire
Mss4	Microsatellite stable de type 4
Na ⁺	Sodium
NCX	Échangeur sodium/calcium
°C	Degré Celsius
PCR	« Polymerase chain reaction » (réaction en chaîne de polymérase)
PGH	Hormone de croissance placentaire
PKA	Protéine kinase A activée par l'AMPc
PKC	Protéine kinase calcium dépendante

PLC	Phospholipase C
PMCA	Pompe à calcium de la membrane plasmique
PTH	Parathormone
PTH1R	Récepteur à la PTH 1
PTH2R	Récepteur à la PTH 2
PTH3R	Récepteur à la PTH 3
PTHrP	« Parathyroid-hormone-related protein » (protéine apparentée à l'hormone parathyroïdienne)
PTX	Toxine de pertussis
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G trimériques
TCTP	« Translationally controlled tumor protein » (protéine tumorale de régulation de traduction)
TIP39	Peptide Tubero-infundibulaire de 39 résidus
TM	Transmembranaire
TNF	« Tumor necrosis factor » (facteur de nécrose tumorale)
TRP	« Transient receptor potential » (récepteurs transitoires de potentiels)
TRPV	« Transient receptor potential vanilloid » (récepteurs transitoires de potentiels de type vanilloïde)
VIP	« Vasoactive intestinal polypeptide » (peptide intestinal vasoactif)

RÉSUMÉ

Durant la grossesse, 30 g de calcium de la mère vers le fœtus sont transférés à travers le placenta à raison de 140 mg/Kg/jour pendant le troisième trimestre. Cet apport calcique est primordial au bon développement du fœtus notamment dans la formation de ses os et ses dents. De plus, le calcium passant au travers du placenta provient à la fois de la diète maternelle et de la résorption des os maternels afin de subvenir convenablement aux besoins fœtaux. Il est donc essentiel que la consommation de calcium par la mère soit suffisante, qu'il y ait une bonne efficacité du transport transplacentaire et que le fœtus présente une bonne aptitude à fixer cet ion. Il existe des protéines permettant le transport de calcium comme les canaux TRPV faisant passer le calcium de la circulation maternelle vers le cytoplasme des syncytiotrophoblastes, les CaBPs responsables du transport de calcium dans le cytoplasme, ainsi que la pompe PMCA assurant le transfert du calcium des syncytiotrophoblastes vers la circulation fœtale contre le gradient de calcium, aidées potentiellement par l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Le but de cette étude est de caractériser la régulation de l'expression de ces protéines responsables du transfert calcique dans le placenta en fonction de la présence ou non de l'action des hormones PTH et PTHrP via le récepteur PTH1R. En effet, ces deux hormones favoriseraient l'expression des protéines à caractère calcium en se liant au récepteur PTH1R. La lignée de cellules de carcinome humain (JEG-3) est traitée ou non avec l'antagoniste aux deux récepteurs PTH (7-34). Les cellules sont traitées pendant 4 jours, et les ARNm sont extraits après 2 et 4 jours de traitement. L'expression des différentes protéines à calcium est quantifiée par PCR en temps réel. On s'attendrait à une diminution de l'expression de celles-ci en absence de signalisation via le récepteur PTH1R puisque PTHrP est un facteur connu pour maintenir le gradient calcique allant de la circulation maternelle à fœtale, et que sa concentration dans la circulation augmente fortement au moment où le transport de calcium est à son maximum ; et la PTH est également connu pour être un facteur hypercalcémiant.

Mots clés : placenta, calcium, transport, PTH, PTHrP, PTH1R

INTRODUCTION

Le placenta est un organe d'une grande complexité permettant au fœtus de se développer au sein de l'organisme maternel. Il est fonctionnel en quelques semaines suite à la conception, remplaçant ainsi les fonctions du corps jaune. Le placenta assure les échanges de nutriments, de minéraux, de gaz et de déchets entre la mère et le fœtus, et de par ces fonctions joue donc le rôle des futurs poumons et reins. Le syncytiotrophoblaste, une cellule polynucléée placentaire, assure le rôle de barrière sélective du placenta, et est caractérisé par la présence d'une membrane à bordure en brosse (BBM), faisant face à la circulation maternelle, et d'une membrane basale plasmique (BPM) faisant face à la circulation fœtale. L'activité de ces membranes syncytiotrophoblastiques est sous l'influence hormonale tant de la mère que du fœtus [1-3].

Le calcium (Ca^{2+}) apporté au fœtus a pour seule origine la circulation maternelle [4, 5]. Durant le dernier trimestre de la grossesse, environ 80 % du calcium total nécessaire au fœtus est transporté à travers le placenta de façon active à un taux élevé de 140mg/kg/jour [6] : certes, le calcium entre, en partie, de façon passive dans le syncytiotrophoblaste [7], mais pour passer du syncytiotrophoblaste à la circulation fœtale à travers la BPM, le calcium nécessite un mécanisme actif de transport [8].

Des recherches ultérieures ont démontré que le transfert de calcium par le placenta est régi par une pléiade d'hormones, dont le peptide apparenté à l'hormone parathyroïdienne (PTHrP) ferait partie [9-12]. La PTHrP provenant du fœtus, du placenta et des tissus mammaires, serait la principale hormone responsable de la régulation calcique et du métabolisme osseux durant la grossesse tant chez la mère que chez le fœtus [13-16].

D'autre part, le syncytiotrophoblaste exprime, entre autres, des protéines, membranaires ou cytoplasmiques, impliquées dans le transfert actif du Ca^{2+} . Parmi elles se trouvent les protéines liant le Ca^{2+} (CaBPs et TCTP), les canaux calciques TRPV5 et TRPV6 ainsi que la pompe à calcium PMCA.

Cependant, la fonction spécifique de ces protéines et leurs régulations par la PTHrP restent en partie inconnues. Considérant que le Ca^{2+} est indispensable tout au long de la croissance et de l'existence, de la vie fœtale à la vie adulte, il serait intéressant de connaître l'influence de la PTHrP sur le niveau d'expression de différentes protéines responsables du transport calcique, ceci dans l'optique d'avoir une meilleure compréhension de la régulation hormonale du transport calcique transplacentaire.

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 LE PLACENTA HUMAIN ET SA COMPOSITION

1.1.1 Caractéristiques générales

Le placenta, propre aux mammifères, est un organe autonome et transitoire. Il assure des fonctions qui, chez l'adulte, sont assurées par le poumon, les reins et l'intestin. Il nourrit, oxygène et épure l'embryon, puis le fœtus, tout au long de la vie intra-utérine [17]. Le placenta humain est de type hémochorial, signifie que la circulation fœtale est séparée de la circulation maternelle par un syncytium [18]. Il est composé du cordon ombilical, des membranes amniotiques et chorioniques, du parenchyme vilieux et de la *décidua* [19, 20].

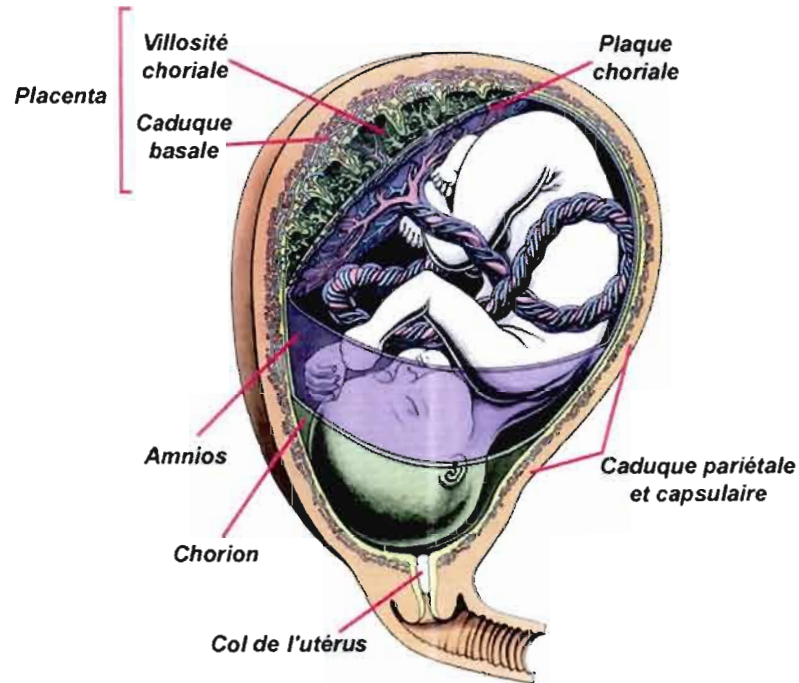


Figure 1-1 : Diagramme d'un fœtus à terme *in utero* incluant une vue du placenta. Tiré de Gray, H., Bannister, L.H. Berry, M.M. Williams, P.L., 1995 [21].

1.1.2 De la fécondation à la nidation

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.

Après la fécondation, le zygote provenant de la fusion des noyaux de l'ovocyte et du spermatozoïde subit une série de divisions sans croissance cellulaire. Au bout de quatre jours, on compte seize à trente-deux cellules, le zygote ressemble alors à une

mûre et est ainsi nommé morula. Dès le stade huit cellules de la morula, les cellules de la périphérie s'aplatissent et acquièrent une polarité qui conduit à la ségrégation de quelques cellules au centre de la morula et d'autres à la périphérie. La masse cellulaire interne à l'origine de l'embryon est appelée embryoblaste. La masse cellulaire externe est le trophoblaste et constitue la première membrane du placenta. Au quatrième jour de développement se forme une cavité au sein de la morula nommée blastocèle. Les cellules trophoblastiques s'organisent en un épithélium. Lorsque le blastocyste arrive dans la cavité utérine, il se sépare de la zone pellucide et interagit directement avec l'endomètre. Ce contact permet aux cytotrophoblastes villositaires de fusionner pour former le syncytiotrophoblaste, couche externe de la villosité flottante impliquée dans les fonctions d'échange de gaz et de nutriments entre la mère et le fœtus formant dès lors une masse protoplasmique multinucléée sans limite cellulaire. Les cytotrophoblastes situés à la base des villosités crampons, prolifèrent pour former des colonnes ancrées dans l'endomètre et une coque cellulaire, à l'origine du trophoblaste extravilloux [22]. Les deux couches cellulaires, constituées de syncytiotrophoblastes et de cytotrophoblastes, s'infiltrèrent entre les cellules épithéliales de la muqueuse utérine en induisant leur apoptose et créent une brèche par laquelle le blastocyste pénètre dans l'endomètre. Le blastocyste pénètre complètement dans l'endomètre en obturant le point d'implantation par un caillot de fibrine. Une cavité amniotique commence à se former dans l'épiblaste puis s'agrandit et une couche de cellules se différencie en amnioblaste pour la séparer du cytotrophoblaste. Des vacuoles extracytoplasmiques apparaissent dans le syncytiotrophoblaste ; elles vont se rassembler pour former des lacunes remplies de fluides tissulaires et de sécrétions utérines. En progressant dans l'endomètre le blastocyste se rapproche des capillaires sanguins maternels. Grâce à l'activité lytique du syncytiotrophoblaste, les parois des capillaires de l'endomètre sont progressivement digérées, permettant au sang de s'écouler dans les lacunes du syncytiotrophoblaste. Le syncytiotrophoblaste continue son extension, enveloppant un grand nombre de capillaires sanguins et étendant de ce fait son réseau lacunaire.

Cette extension est indispensable à l'établissement d'un réservoir artériel et d'un système de drainage veineux, première étape de la mise en place du placenta.

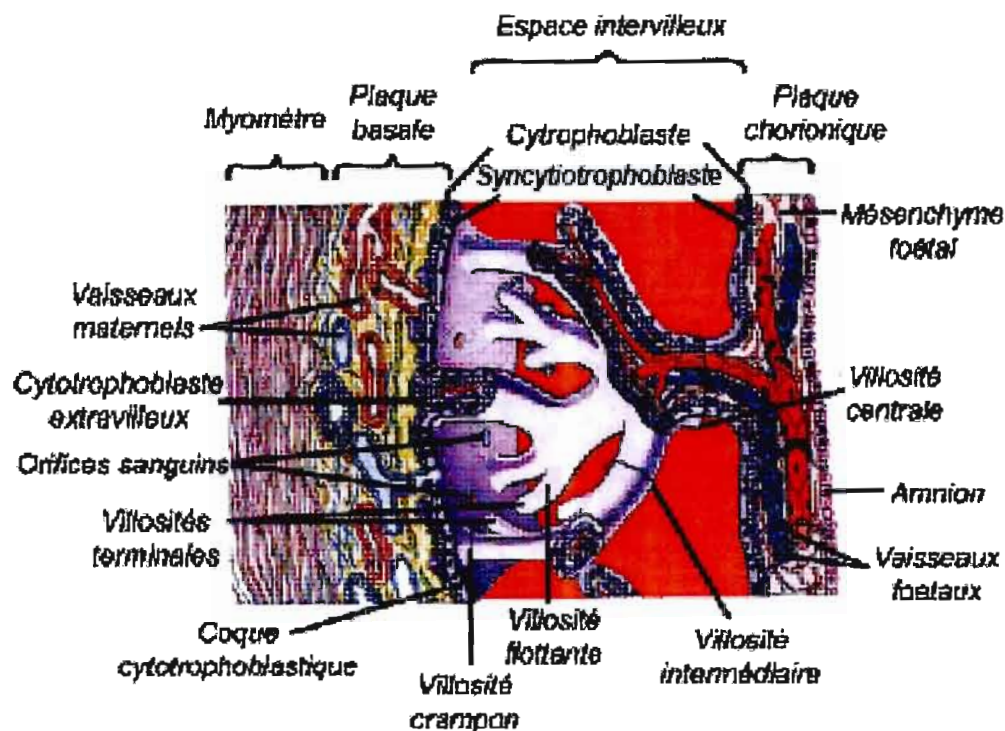


Figure 1-2 : Diagramme de l'organisation des tissus placentaires. Tiré de Gray, H., Bannister, L.H. Berry, M.M. Williams, P.L., 1995 [21].

1.1.3 La cellule syncytiotrophoblastique

Le syncytiotrophoblaste est la principale unité d'échange placentaire. C'est une cellule polynucléée constituant une barrière permissive mais sélective entre les sangs maternel et fœtal. La proximité des sangs facilite les échanges et les arborisations que forment les syncytiotrophoblastes et augmentent la surface potentielle d'échange [23]. Le syncytiotrophoblaste assure différentes fonctions en plus des échanges, telles

que la nutrition, la respiration et l'élimination de déchets du fœtus, mais c'est aussi un tissu où le métabolisme placentaire, la synthèse de facteurs de croissance et d'hormones placentaires ont lieu [24-26]. La sécrétion d'hormones placentaires est une fonction essentielle puisque le syncytiotrophoblaste est considéré comme étant la seule cellule endocrine du placenta. Ces hormones, telles que la progestérone, l'œstrogène, la hCG (*human chorionic gonadotropin*), la hPL (*human placental lactogen*), la PGH (hormone de croissance placentaire) et plusieurs autres, contribuent au développement mais aussi au maintien du placenta et à l'adaptation de la mère à la grossesse [27].

1.1.4 Les membranes syncytiotrophoblastiques

Le syncytiotrophoblaste module le transport des nutriments et des déchets selon la bipolarité des cellules [28]. En effet, le syncytiotrophoblaste, qui est hautement polarisé, possède sur sa membrane apicale (BBM) de nombreuses villosités, celles-ci étant grandement vascularisées et constituées de sinusoides qui ralentissent le sang maternel pour faciliter les échanges, alors que les membranes basales plasmiques (BPM) sont des membranes basales [1, 29, 30]. Ainsi, le mouvement du calcium, entre autres, implique la participation de chaque pôle du syncytiotrophoblaste.

Ces deux types de membranes diffèrent de par leur structure et donc de par leurs fonctions [31] mais elles présentent également des similitudes quant à la présence de certaines protéines comme c'est le cas pour des récepteurs impliqués dans la régulation du transport de Ca^{2+} de la mère vers le fœtus. En effet, tant sur les BBM que sur les BPM, des récepteurs à la parathormone (PTH) [29], et à la calcitonine [32] sont présents.

Un syncytium trophoblastique présente également une dichotomie au niveau de la répartition de protéines telles que des transporteurs, des enzymes, des récepteurs [3]. La BBM est caractérisée par la présence de l'activité phosphatase alcaline [29, 32] et des récepteurs β -adrénergiques [33], contrairement à la BPM plutôt riche en Na^+/K^+ -ATPases [34]. De plus, une caractéristique s'appliquant plus particulièrement au projet de recherche dont il est question, les BPM possèdent deux types de système de transport calcique, dont l'un est dépendant de l'ATP [29, 32], alors que les BBM ne possèdent qu'un système de transport de Ca^{2+} indépendant de l'ATP [31].

1.2 LE TRANSPORT PLACENTAIRE

1.2.1 Caractéristiques du transport placentaire

Le placenta est une membrane semi-perméable à travers laquelle le passage des nutriments se fait selon plusieurs modalités : la diffusion simple (ex : eau, urée), la diffusion facilitée (ex : oxygène, glucose), le transport actif (ex : calcium, fer, acides aminés) et l'endocytose.

Les éléments utiles à la production d'énergie et au développement foetal sont transportés via le placenta à partir du sang maternel [35, 36]. Certaines substances, comme le glucose ou les acides gras, nécessitent un transport facilité via des transporteurs protéiques, selon un gradient de concentration, entre la mère et son foetus. Le transport d'autres substances, comme les acides aminés et le calcium, se fait contre un gradient de concentration, et nécessite de par ce fait de l'énergie [37].

Le transport placentaire à travers le syncytiotrophoblaste est dépendant de certains facteurs tels que la surface de contact disponible pour les échanges, la vitesse des flots sanguins maternel et foetal, la présence de transporteurs protéiques dans les

membranes (BBM et BPM) ainsi que la perméabilité de ces dernières. Le transport est généralement bidirectionnel et asymétrique de part et d'autre des membranes syncytiotrophoblastiques. C'est cette dernière caractéristique qui permet l'apport de substrats de la mère vers le placenta et le fœtus [38]. Par conséquent, les échanges materno-fœtaux sont très complexes. Le placenta n'a pas seulement un rôle de barrière mais il peut aussi transformer, distribuer et même emmagasiner différents substrats nécessaires au fœtus.

1.2.2 Le transport du Ca^{2+}

Le calcium est un ion essentiel à la croissance du fœtus en ce qui a trait à la formation de son squelette, au fonctionnement intracellulaire de ses cellules (les cellules musculaires par exemple). Mais cette forte demande de Ca^{2+} , surtout lors du troisième trimestre de grossesse, est soumise à une importante régulation. En effet la demande de Ca^{2+} par le fœtus est régulée par trois facteurs : 1) la consommation suffisante de Ca^{2+} par la mère, 2) l'efficacité du transport transplacentaire, 3) l'aptitude du fœtus à disposer de cet ion [39].

Quatre vingt dix neuf pourcents du calcium corporel est emmagasiné dans les dents et les os, et en cas d'hypocalcémie les os représentent une réserve calcique importante [40]. De grandes quantités de calcium sont donc nécessaires à la minéralisation du squelette fœtal en croissance (7mmol/jour durant le troisième trimestre).

Lors de la grossesse, la concentration calcique de part et d'autre du placenta est maintenue plus élevée du côté fœtal par rapport au côté maternel [41]. En effet, les concentrations totales et ioniques de Ca^{2+} , dans le sang du cordon ombilical, excèdent celles du sang maternel, indiquant que le placenta transfère via un processus actif

[42]. Ainsi, durant une grossesse humaine, 30 g de Ca^{2+} de la mère vers le fœtus, sont transférés à travers le placenta à raison de 140 mg/Kg/jour pendant le troisième trimestre [6, 43].

Les besoins calciques du fœtus sont donc considérables, et grâce à un afflux net en sa faveur, il est maintenu en hypercalcémie par rapport à sa mère avec une concentration calcique dans le sang maternel de 2,13 mM, 2,65 mM pour le fœtus et pour le cytoplasme du syncytiotrophoblaste 10-100 mM. Il est donc clair que le transfert de calcium au travers des deux membranes syncytiotrophoblastiques fait appel à différents mécanismes comme la diffusion, le transport actif et facilité, et l'endocytose/exocytose [44, 45].

Dans un premier temps, le calcium est diffusé passivement du sang maternel au cytoplasme syncytiotrophoblastique par la BBM grâce au gradient électrochimique favorable. Cette étape serait cependant limitante d'après des études avec des placentas perfusés de rats *in situ* [46]. Au sein du syncytiotrophoblaste, le calcium est véhiculé par des protéines liant cet ion, afin que le Ca^{2+} nécessaire à la croissance du fœtus, n'interfère pas avec les mécanismes intracellulaires du syncytiotrophoblaste. Ces protéines de liaison vont transférer le calcium des BBM vers les BPM. Pour acheminer le Ca^{2+} du cytoplasme syncytiotrophoblastique au sang fœtal, un transport actif au niveau de la BPM est nécessaire. Ce transport, qui est stimulé par l'ATP, est donc saturable en l'absence de ce dernier et inhibé en présence de magnésium [8, 47, 48].

Le placenta constitue un important organe d'échanges entre la circulation maternelle et la circulation fœtale. Ces échanges, comme vu ci-dessus, se font tant par la diffusion passive que par des systèmes sélectifs et actifs de transport ; les systèmes de transports actifs étant localisés sur les membranes trophoblastiques face au sang maternel. Contrairement au flux de nutriments de la mère au fœtus, les constituants

physiologiques passant de la circulation fœtale à celle de la mère s'effectuent principalement par simple diffusion au travers des différentes membranes syncytiotrophoblastiques [49].

1.3 LES HORMONES HYPERCALCÉMIANTES

Au terme d'une grossesse, la concentration plasmatique en ions calcium est supérieure chez le fœtus que chez la mère [50]. Afin de réguler ce transport calcique via le placenta, plusieurs hormones entrent en action comme la calcitonine (CT) [51], PTH et la PTHrP [52]. Dans ce projet, seules la PTH et la PTHrP seront discutées.

Chez l'homme, les gènes de la PTH et de la PTHrP sont portés par le bras court des chromosomes 11 et 12, respectivement [53, 54]. Les gènes de la PTH et de la PTHrP auraient une origine phylogénétique commune [55]. Ces deux gènes seraient en effet issus d'une duplication ancestrale d'un chromosome commun. L'analyse de leur structure génomique a montré que le gène de la PTHrP était beaucoup plus complexe que celui de la PTH [56].

1.3.1 L'hormone parathyroïdienne (PTH)

1.3.1.1 Expression, synthèse et sécrétion

La PTH est une hormone peptidique de 84 acides aminés, sécrétée par la glande parathyroïde et dont le gène codant le précurseur de celle-ci se trouve sur le bras court du chromosome 11 [54]. Le précurseur de la PTH, la prépro-PTH, voit sa portion « pré » rapidement clivé puisque suite à sa synthèse ce fragment « pré » est coupé par

une peptidase au sein du réticulum endoplasmique : le résultat de ce clivage en est la pro-PTH. Suite au passage de la pro-PTH dans l'appareil de Golgi, la portion « pro » est à son tour clivée pour finalement donner la PTH mature qui est alors stockée dans des vésicules de sécrétion avant sa libération [57].

La concentration sérique de calcium contrôle la sécrétion rapide de la PTH [57] via la présence d'un récepteur, le CaSR (*Calcium-Sensing Receptor*), présent à la surface des cellules parathyroïdiennes, sensible aux concentrations calciques [58]. En effet, une faible concentration en Ca^{2+} déclenche par le CaSR la fusion des vésicules de sécrétion avec la membrane plasmique de la glande parathyroïde libérant ainsi la PTH mature. Une forte concentration calcique sanguine inhibe au contraire sa sécrétion [57]. Il semblerait même que des concentrations sanguines élevées en calcium engageraient un processus de dégradation de la PTH au sein même des vésicules de sécrétion [59]. En plus de ce système de régulation mis en place rapidement, il peut y avoir intervention des modes de régulation à long terme impliquant par exemple la prolifération des cellules parathyroïdiennes stimulée par le calcium sérique et par la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [60].

La concentration de la PTH est finement régulée par un mécanisme impliquant la dégradation rapide de cette hormone lorsqu'elle est dans le sang même en absence de liaison avec le récepteur. La PTH est donc principalement dégradée dans le foie (60-70%), mais aussi dans les reins (20-30%) et dans certains autres tissus [61]. Au niveau du foie, la dégradation va se faire selon le processus de protéolyse rapide par les cellules de Küpffer [62] alors que les reins l'élimine par filtration glomérulaire [63].

1.3.1.2 Rôles de la PTH

Le rôle principal de la PTH est la régulation de la concentration sérique en calcium par une action sur les os, les reins et les intestins. Lorsque la PTH agit au niveau des os, elle engendre l'activation des ostéoclastes et donc une résorption osseuse dégradant la matrice osseuse afin de libérer du calcium dans le sang lorsque les concentrations sériques de ce dernier sont trop faibles [64]. Cet effet peut être induit par la liaison de la PTH, plus particulièrement son fragment N-terminal (1-34), au récepteur activant l'AC [65]. En revanche, la production d'AMPc et donc l'activation de la PKA, ne seraient pas la voie de signalisation cellulaire impliquée dans la résorption osseuse, puisqu'en présence d'un inhibiteur de l'AC l'effet sur les os est inchangé [66]. La toxine de *Bordetella pertussis* (PTX) est un inhibiteur de l'activation des protéines G_i . En sa présence, la résorption osseuse engendrée par la PTH se voit inhibée, ce qui voudrait dire qu'en se liant à son récepteur, la PTH stimule la protéine G_i qui inhibe l'activité de l'AC. Au contraire, en présence de PTX, la protéine G_i est inactive au profit de l'activité de l'AC qui est alors non inhibée entraînant une accumulation d'AMPc qui empêcherait la résorption osseuse [67]. En revanche, ces résultats *in vitro* dépendent de l'état de différenciation des cellules utilisées [68], ce qui implique que la réponse cellulaire est dépendante de l'état de développement du squelette et donc des hormones circulantes qui elles-mêmes dépendent des besoins calciques foetaux.

Au niveau du rein, la concentration calcique sanguine peut être augmentée par le mécanisme de réabsorption, entre autres. L'activation de la PKC et de la PKA en réponse à la PTH, stimule le transport de calcium dans une culture primaire de tubules distaux murins [69]. La PTH agit également sur la production de $1,25(OH)_2D_3$ [70] la modulant afin de répondre ou non aux concentrations calciques.

Dans l'intestin, la PTH favorise, par l'activation de la PLC, par une augmentation d'AMPC et une ouverture des canaux sensibles à la DHP (récepteur de la dihydropyridine), l'augmentation d'incorporation de calcium dans les entérocytes du duodénum de rat [71]. La PTH agit de concert avec la 1,25(OH)₂D₃ qui, elle, favorise une entrée rapide de calcium et une augmentation d'expression d'une protéine de liaison calcique, la CaBP-9k [72].

PTH (1-84)	PTH (7-84)
Réabsorption tubulaire distale du calcium	Antagonisme compétitif de la PTH (1-84) sur PTH1R
Inhibition réabsorption tubulaire proximale du phosphore	Internalisation du PTH1R au niveau tubulaire distal
Mobilisation du calcium osseux	Inhibition de la résorption osseuse par activation du récepteur PTH2R
Production 1,25(OH) ₂ D ₃	

Tableau 1-1 : Effets sélectifs des différentes molécules de la PTH [73].

1.3.1.3 Rôles de la PTH pendant la grossesse

Au tout début de la grossesse, cette hormone hypercalcémiante voit son niveau diminuer. Sa concentration augmente légèrement durant les deux premiers trimestres de grossesse sans pourtant atteindre son taux préalable, c'est-à-dire avant la grossesse. Lors du dernier trimestre, les taux circulants de PTH diminuent à nouveau mais légèrement [13].

La PTH se lie aux BBM et aux BPM des syncytiotrophoblastes. En se liant aux BPM, et plus particulièrement le fragment PTH (1-34), il s'en suit une augmentation d'AMPc [29, 74]. La PTH est une hormone peptidique qui ne peut traverser le placenta [75] et qui n'est présente qu'en faible quantité dans le sang fœtal [76]. Le rôle de la PTH pour le développement du fœtus paraît évident en observant les cas d'hyper- ou d'hypoparathyroïdie. En effet une hypocalcémie chez la mère entraîne, chez le fœtus, une hypertrophie de la glande parathyroïde ayant pour conséquence une augmentation de la PTH dans le sang, une déminéralisation de ses os, ainsi qu'une élévation de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ et autres symptômes [77]. En revanche, dans le cas d'une hypercalcémie maternelle, le développement de la glande parathyroïdienne fœtale est affecté et accompagné d'une hypocalcémie chez le nouveau-né. Une calcification placentaire est également conservée ainsi qu'un retard de croissance. Ces symptômes peuvent aller jusqu'à un avortement spontané ou une mort intra-utérine [77-79]. À la vue de ces observations, il est inévitable de penser que la PTH a un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie calcique, tant plasmatique qu'interstitielle, durant la grossesse [80].

1.3.2 Le peptide apparenté à la parathormone (PTHrP)

1.3.2.1 Caractéristiques de la PTHrP

Cette hormone est constituée de 141 acides aminés et est importante pour le développement du fœtus au cours de la grossesse [81]. La PTHrP est apparentée à la PTH (d'où son nom) puisqu'elle possède des ressemblances avec la PTH au niveau de son action biologique (la PTHrP stimule la production d'AMPc seulement dans les tissus où la PTH agit) [81] mais également au niveau structural. En effet, ces deux hormones partagent les mêmes huit acides aminés parmi les treize premiers de la partie N-terminale qui composent la structure primaire de chacune. Ces treize premiers acides aminés, à 70% d'homologie entre la PTH et la PTHrP, sont essentiels

à l'interaction avec les récepteurs à la PTH. À partir du 14^{ième} acide aminé, la séquence diverge totalement entre les deux peptides mais la structure tridimensionnelle reste comparable jusqu'au 34^{ième} acide aminé, permettant ainsi à ces deux peptides de se lier au même récepteur, le PTH1R, par leur partie N-terminale. Ces deux hormones ne diffèrent, en fait, que par leur partie C-terminale [82-85].

1.3.2.2 Structure du gène

La structure du gène a été décrite au début des années 1990 chez l'homme, le rat et la souris [56, 86, 87]. Gène de 15 Kpb, il se situe sur le bras court du chromosome 12 dans une position similaire au gène de la PTH localisé sur le chromosome 11. Le gène de la PTHrP est constitué de IX exons et code pour trois ARNm produisant chacun une protéine. Ces trois isoformes de 139, 141 et 173 acides aminés diffèrent les unes des autres de par leur partie C-terminale. Trois promoteurs, consistant en des boîtes « TATA » et ne possédant aucune séquence consensus, se situent en amont de l'exon I et entre l'exon III et IV respectivement [88-90]. Le gène de la PTHrP comprend, en plus de ces trois promoteurs, des séquences de régulation en « cis » incluant :

- des séquences activatrices (« *enhancers* » : activateurs) en amont de l'exon IV,
- des séquences extinctrices (« *silencers* » : silenceurs) en amont de l'exon I,
- différents sites de liaison pour des facteurs de transcription tels que SP-1, AP-1 et AP-2 en 5' de l'exon I et dans les exons III et IV,
- des régions similaires au motif « cyclic AMP response element » (CRE) en 5' de l'exon I et dans l'exon IV,

- des séquences nucléotidiques consensus pour la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ et les glucocorticoïdes, en 5' de l'exon I et dans l'exon I et IV [53, 89, 91, 92].

La PTHrP possède une séquence putative prépro de 36 acides aminés en 5' de son ARNm. Les acides aminés -36 à -8, -9 constituent la séquence pré qui se compose de 10 à 15 acides aminés hydrophobes encadrés d'acides aminés chargés. Grâce à la séquence prépro, l'ARNm synthétisé dans le cytosol est acheminé vers le réticulum endoplasmique rugueux. À ce niveau, l'enzyme « signal peptidase » clive l'ARNm au niveau de l'acide aminé -8, -9 lors de la traduction [56]. Le séquençage de la protéine a permis de déterminer que la PTHrP mature débutait avec une alanine [84, 93, 94]. Les acides aminés -8 à -1 constituent donc la séquence « pro » possédant la séquence $\text{Arg}^{-5}\text{-Arg-Leu-Lys-Arg}^{-1}$ qui est le substrat de la furine, une pro-hormone convertase. Cette dernière produit différentes formes de PTHrP mature en la protéolysant post-traductionnellement :

- le fragment N-terminal : PTHrP (1-36)
- les fragments intermédiaires
- le fragment C-terminal : PTHrP (107-139)
- Le fragment C-terminal extrême : PTHrP (141-173)

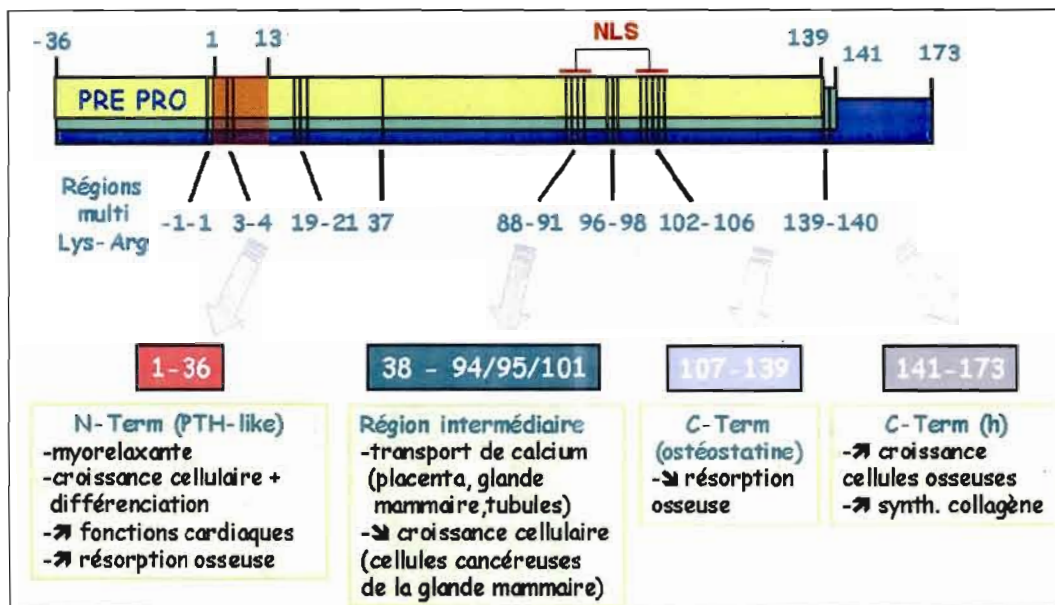


Figure 1-3 : Représentation schématique des trois isoformes initiales de la PTHrP issues de l'épissage alternatif de l'ARN pré-messager. Les modifications post traductionnelles consistant en une endoprotéolyse au niveau des sites multi-basiques génèrent les formes matures de sécrétion N-terminale, intermédiaire et C-terminale de la PTHrP. Les principales fonctions physiologiques connues de ces formes matures sont précisées. NLS signifie séquence de localisation nucléaire. Tiré de Clemens, T.L., et al., 2001 [87].

1.3.2.3 Rôles de la PTHrP pendant la grossesse

Dès le début de la grossesse, les cellules trophoblastiques sécrètent la PTHrP, alors qu'à partir de la neuvième semaine de grossesse environ et jusqu'à la fin de celle-ci, la sécrétion de PTHrP se fait principalement par les glandes parathyroïdiennes du fœtus [51]. Cette sécrétion est essentielle pour le maintien du flux calcique entre la mère et le fœtus [95]. En effet, chez des souris « knock-out » pour le gène de la PTHrP et le gradient calcique materno-fœtal serait inversé [11]. Dans cette étude, il est dit que les souris gestantes étant en carence de PTHrP auraient une concentration

calcique inférieure à celle mesurée chez les souris normales, et que le transport placentaire calcique serait diminué.

La PTHrP a un impact sur la prolifération cellulaire et la différenciation pour certains types cellulaires. Le facteur nécrosant tumoral (TNF) ainsi que le facteur de croissance épidermal (EGF) stimulent la sécrétion de PTHrP dans des cellules telles que les astrocytes fœtaux humains normaux. Cette sécrétion de PTHrP aurait pour impact la suppression de la prolifération [96]. Dans le tissu de la peau, la PTHrP joue également un rôle, puisque des souris « knock-out » pour le gène de la PTHrP montrent un épiderme plus fin, un sous développement des glandes sébacées ainsi que d'autres anomalies épidermiques. Ici, la PTHrP contrôlerait la différenciation des kératinocytes [97]. La PTHrP a donc un rôle primordial dans les phénomènes de différenciation et de croissance cellulaire.

Lors d'une grossesse, la PTHrP est en perpétuelle augmentation dans le sang maternel : le placenta doit contenir une grande quantité de PTHrP [13]. L'équipe d'Abbas *et al.* (1989) ont réussi à améliorer le gradient calcique de fœtus parathyroïdectomisés en injectant les fragments (1-84), (1-108) et (1-141) de la PTHrP, ou encore une purification de PTHrP issue de cellules oncogènes de poumons humains [98]. Rodda *et al.* (1988) ont obtenu la même amélioration mais en injectant des extraits de parathyroïdes fœtales [95]. Cependant la PTHrP(1-34) n'encourage pas le transport calcique lors d'une perfusion de placenta de brebis contrairement au fragment (1-141) [98]. De plus, les fragments (1-84) et (1-108) de la PTHrP sont plus efficaces comparativement au fragment (1-141). Cette observation est appuyée par le travail effectué par Care *et al.* (1990) qui constatent que le fragment (67-86) de la PTHrP stimule le transport calcique lorsque des placentas de brebis sont perfusés. Il y aurait donc une étape de régulation post-traductionnelle au niveau du placenta [10]. En revanche, peu de renseignements sur son impact au niveau d'autres protéines de transport calcique et/ou de leurs ARNm sont connus à ce jour, mais le fait que

l'expression embryonnaire et fœtale de ce peptide est très étendue et que son niveau d'expression augmente tout au long de la grossesse laisse penser que la PTHrP joue un rôle essentiel lors de la gestation.

1.4 RÉCEPTEURS AUX HORMONES HYPERCALCÉMIANTES

La PTHrP agit de toute évidence via divers récepteurs dont un seul a été cloné et bien caractérisé : le PTH1R. Il s'agit du récepteur commun PTH/PTHrP capable de fixer aussi bien la PTH que la PTHrP. En 1995, un autre récepteur a été isolé et cloné, dénommé PTH2R qui reconnaît la PTH mais pas la PTHrP [99]. Un troisième récepteur du système PTH/PTHrP a plus récemment été identifié chez le poisson zèbre, le PTH3R qui reconnaît la PTHrP et avec une moindre affinité la PTH [100]. Ce récepteur pourrait être spécifique de certaines espèces de poissons car il n'est pas retrouvé chez d'autres espèces animales.

1.4.1 Le récepteur à la PTH/PTHrP de type 1 : PTH1R

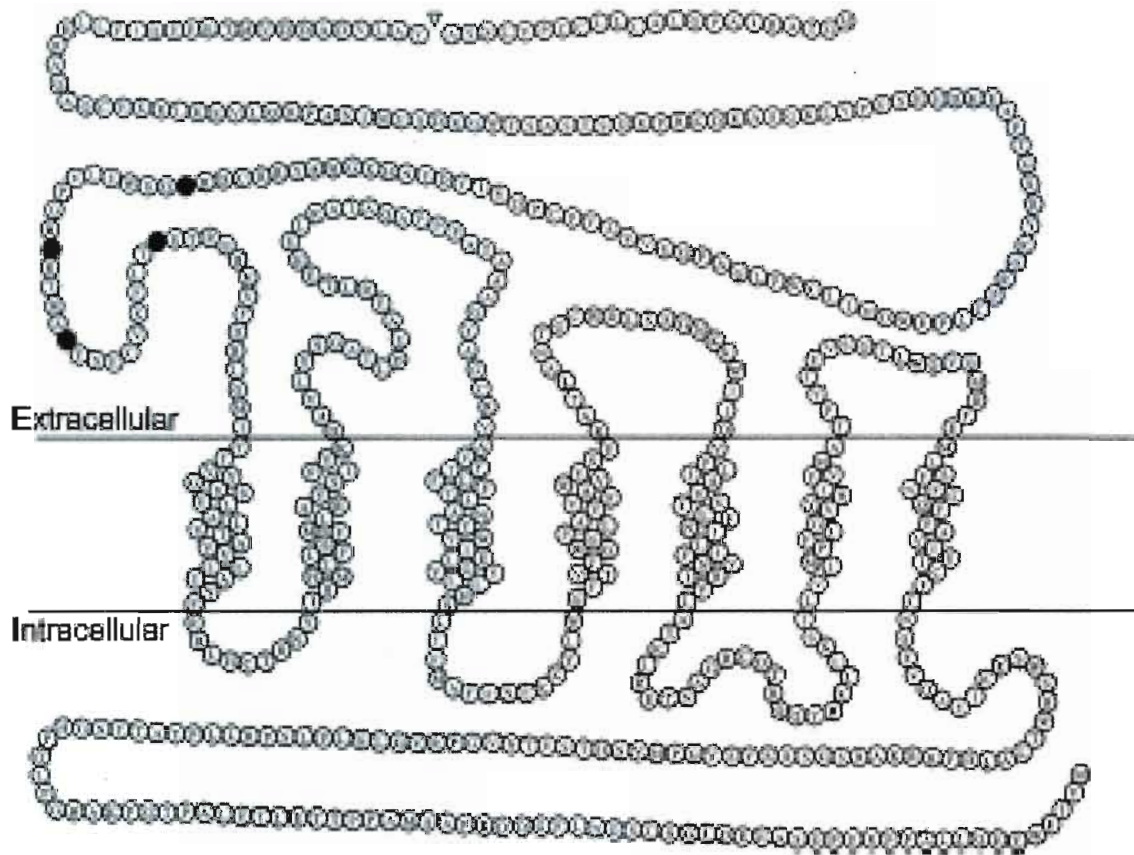


Figure 1-4 : Représentation schématique du PTH1R. La séquence en acides aminés est montrée avec la localisation des domaines transmembranaires. La large boucle N-terminale est représentée au haut du diagramme. Le triangle inversé indique le site de clivage pour la séquence signal de 23 acides aminés. Les cercles noirs représentent les sites de N-glycosylation. Tiré de Gensure, R.C., T.J. Gardella, and H. Juppner, 2005 [101].

1.4.1.1 Généralités

Le PTH1R fait partie d'une sous-famille de récepteurs à 7 segments transmembranaires couplés aux protéines G [102, 103] appartenant à la famille des récepteurs à la sécrétine, la calcitonine ou encore le VIP [102, 104-106]. Le clonage moléculaire du PTH1R et de ces derniers ont permis de les classer dans une nouvelle catégorie, la classe II ou B, qui se distinguent de la classe des récepteurs β 2-adrénergiques (classe I). Ces récepteurs sont couplés aux protéines G (RCPG) et sont caractérisés par sept hélices transmembranaires reliées entre elles par des boucles hydrophiles d'environ 280 acides aminés, un domaine N-terminal extracellulaire particulièrement long (d'environ 150 résidus) pouvant être glycosylé et une extrémité C-terminale cytoplasmique d'environ 130 résidus pouvant être phosphorylée par les kinases des récepteurs couplés aux protéines G, la PKA et la PKC. De plus, il y a présence de résidus hautement conservés dans sa séquence: huit résidus cystéine dont six se trouvent dans l'extrémité N-terminale extracellulaire du PTH1R et les deux restants dans les boucles extracellulaires 1 et 2 [102, 103, 107]. De par leur localisation, ces deux cystéines sont probablement impliquées dans la formation de ponts disulfures.

1.4.1.2 Structure du gène

Le PTH1R a été cloné au début des années 1990 chez plusieurs espèces animales incluant le rat, la souris et l'homme et plus récemment chez le chien [56, 102, 103, 108]. Il apparaît dans diverses études phylogénétiques que le gène du PTH1R est très conservé à travers les espèces, tout comme le gène de la PTHrP. Chez l'homme, il est situé sur le bras court du chromosome 3 (en 3p21.1-22) et s'étend sur environ 22 Kpb d'ADN génomique et est constitué de 17 exons (14 exons codants et 3 exons non-

codants). Il code pour une protéine de 60kDa (90kDa lorsqu'elle est glycosylée) qui lie aussi bien la PTH(1-34) que la PTHrP(1-36) [102, 103]. Il y a plusieurs isoformes d'ARNm du récepteur dû à la présence de 3 promoteurs dénommés P1, P2 et P3 (ce dernier ne serait actif que chez l'homme) [102, 103, 109] dont l'activité dépend du tissu où il est exprimé, et à la présence de 3 exons non traduits en 5' dénommés U1, U2 et U3. L'activité de P1 est spécifique au rein humain adulte tandis que P2 est le seul promoteur actif au cours de la vie foetale [110]. Le promoteur P3 (chez l'homme) est plus particulièrement actif dans le rein, mais aussi exprimé dans de nombreux tissus humains, rendant alors la régulation de l'expression du gène du PTH1R encore plus complexe [111].

1.4.1.3 Régulation de l'expression

Les promoteurs P1 chez l'homme et la souris contiennent plusieurs sites d'initiation répartis sur plus de 100 pb [110, 112] et environ 50% de motifs riches en GC. Leurs promoteurs P2 sont très riches en GC et possèdent des sites d'initiation unique dans les régions contenant le facteur de transcription Sp1 [110, 113]. Le promoteur P3 contient, quant à lui, de nombreux motifs riches en GC et présente également des sites pour les facteurs de transcription SP-1 et Maz [114]. D'autre part, l'état actif/inactif du promoteur est modulé par méthylation de résidus cystéine [110]. La méthylation des promoteurs induit l'inhibition de leur activité. La déméthylation n'est pourtant pas suffisante à l'activation des promoteurs qui sont aussi sous le contrôle des facteurs de transcription.

1.4.1.4 Distribution

Comme la PTHrP, le PTH1R a une distribution ubiquitaire [102, 103]. Le PTH1R est fortement exprimé dans les sites dits « traditionnels » d'action de la PTH que sont l'os et le tubule rénal. Par ses interactions avec les PTH1R présents dans ces tissus, la PTH régule l'homéostasie du calcium ainsi que toute une série d'ions et d'électrolytes. Bien que la PTH circule à des taux faibles de l'ordre du pM, la forte densité de PTH1R présents dans ces sites permet à l'hormone d'exercer ses fonctions régulatrices. À l'opposé de la PTH agissant sur un mode endocrine, la PTHrP agit selon divers modes auto/paracrine et/ou intracrine, propres aux facteurs locaux.

Le PTH1R est plus faiblement exprimé dans les sites d'action dits «non traditionnels» de la PTH. Ces sites regroupent l'ensemble des tissus ou cellules cibles où des propriétés ont pu être mises en évidence pour la PTH avant la découverte de la PTHrP, mais uniquement à des concentrations pharmacologiques, loin des niveaux physiologiques de PTH. Dans ces sites et dans ceux mis en évidence suite au clonage de la PTHrP, le PTH1R est présent en faible densité, insuffisante pour que la PTH puisse exercer une quelconque activité biologique dans les conditions normales. Bien que les concentrations circulantes de PTH peuvent augmenter dans certaines conditions pathologiques, comme l'hyperparathyroïdisme, les niveaux atteints ne sont pas suffisants pour permettre à la PTH d'agir sur ces sites. Ce n'est pas le cas de la PTHrP qui est exprimée localement et qui s'est révélée être le ligand endogène du PTH1R présent dans ces sites, la PTHrP agissant selon un mode auto/paracrine et/ou intracrine pour réguler toute une série de processus biologiques notamment la différenciation et la prolifération cellulaire. Parmi ces cibles non traditionnelles, on notera plus particulièrement le cerveau, les poumons, le foie, le système gastro-intestinal, les testicules, les ovaires, l'utérus, le coeur, les muscles lisses vasculaires et non vasculaires, l'endothélium vasculaire et le placenta [115-117].

1.4.1.5 Systèmes effecteurs couplés et régulation fonctionnelle

En terme de couplage aux systèmes effecteurs, il est bien décrit que selon le type cellulaire le PTH1R est couplé, via les protéines régulatrices G α s ou G α i, au système AC/AMPC/PKA et/ou, via G α q ou G α 11, au système phospholipase C (PLC)/IP3-DAG/ PKC [102, 103]. Un certain nombre d'études a permis de mieux définir la contribution de ces deux voies de signalisation dans les réponses cellulaires à la PTH et à la PTHrP. Il s'avère que le PTH1R n'est pas couplé à ces deux voies avec la même efficacité et que les réponses induites par l'agoniste via la voie de l'AC/PKA sont plus sensibles et plus importantes en intensité que celles via la voie de la PLC/PKC [102, 103]. En outre, il semble que, selon le type cellulaire étudié, l'une ou l'autre voie puisse être préférée par rapport à l'autre. De nombreux sites de phosphorylation sont présents dans la structure primaire du PTH1R pour la caséine kinase II, la PKA, la PKC mais également la β -ARK. L'activité du PTH1R, et donc les propriétés auto/paracrine de la PTHrP (et endocrine de la PTH), est modulée par le phénomène de désensibilisation dont le mécanisme semble être spécifique du tissu considéré [102, 103]. Sept membres de GRKs (*G protein-coupled receptorkinase*) ont été identifiés jusqu'à présent, les GRK-2, 3 et 5 étant impliquées dans la phosphorylation des PTH1R *in vivo* et *in vitro* [118, 119]. L'implication des protéines kinases dépendantes des seconds messagers (PKA et PKC) dans la phosphorylation du PTH1R est controversée [120-123] tout comme l'importance de la phosphorylation dans l'internalisation du PTH1R [119, 123]. Bien que le mécanisme moléculaire par lequel le PTH1R est internalisé n'ait pas encore été formellement identifié, une implication du système β -arrestines/clathrine a pu être mise en évidence [102, 103, 124, 125]. Par contre, l'internalisation du PTH1R ne semble impliquer ni la PKA ni la PKC. Comme dans d'autres systèmes, la phosphorylation du PTH1R constitue également un mécanisme régulateur limitant la stimulation du récepteur.

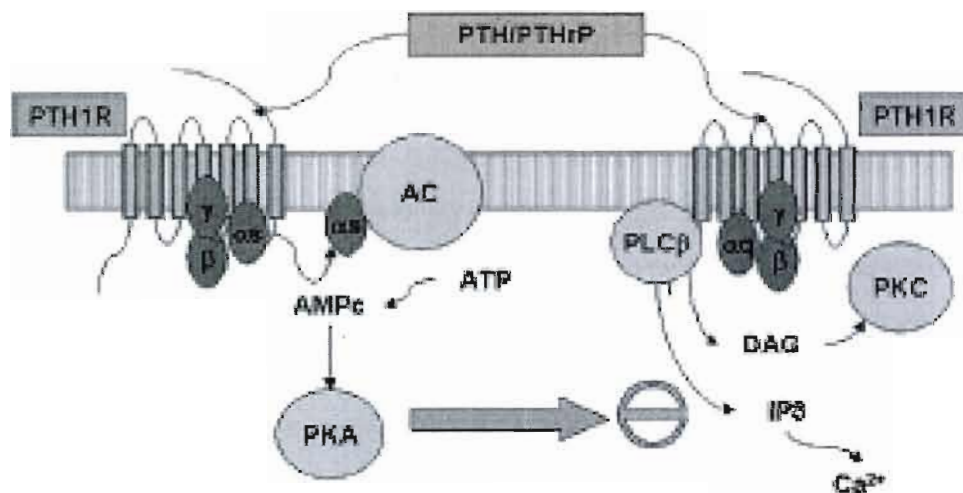


Figure 1-5 : Signalisation du récepteur PTH/PTHrP (PTH1R). Le récepteur commun de la PTH et du PTHrP active deux types de signaux intracellulaires liés aux protéines Gs et Gq, nécessaires pour la différenciation ostéoblastique. Une administration prolongée de PTH rétrocontrôle la voie Gq et bloque la différenciation. Une stimulation prolongée de l'adénylate cyclase est présente dans la dysplasie fibreuse des os par mutation activatrice de la protéine Gs. (PTH : parathormone, PTHrP : PTH related peptide, AC : adénylate cyclase, PKA : protéine kinase A, PKC : protéine kinase C, PLC : phospholipase C, DAG : diacylglycérol, IP3 : inositol trisphosphate). Tiré de Gennero, I., et *al.*, 2004 [126].

1.4.1.6 PTH1R et désordres génétiques

Deux maladies génétiques humaines ont récemment été associées à des mutations du gène du PTH1R. Il s'agit des chondrodysplasies de Jansen et de Blomstrand, associées respectivement à des mutations activatrices et inhibitrices de l'activité du PTH1R. Le phénotype observé chez les patients atteints de la maladie de Jansen est un désordre autosomique dominant caractérisé par un raccourcissement des membres associés à une hypercalcémie et une hypophosphatémie indépendante de l'agoniste [127].

La chondrodysplasie de Blomstrand, qui est létale dans les derniers mois de grossesse, est un désordre autosomique récessif caractérisé par une mort prématurée des chondrocytes. Les os longs sont courts avec une densité augmentée et une absence de plaque de croissance [128]. Ces deux formes de chondrodysplasie révèlent l'importance du PTH1R pour le développement normal du squelette mais peut également avoir des conséquences sur le fonctionnement d'autres organes chez l'homme.

1.4.2 Le récepteur à la PTH/PTHrP de type 2 : PTH2R

Le PTH2R est le second membre des récepteurs de la PTH à avoir été cloné, séquencé et identifié. Il fait partie de la famille des récepteurs liés aux protéines G, dont l'ARNm est exprimé dans le placenta [99], et exprimé majoritairement dans le cerveau, le pancréas, et dans le système cardiovasculaire [129]. Sa séquence en acides aminés présente 52% d'homologie avec le PTH1R humain. En effet, 33 résidus sur 67 de la partie N-terminale sont communs au PTH1R et au PTH2R. Il existe également une similitude d'acides aminés entre le PTH2R et les autres récepteurs de la classe II des RCPGs (sécrétine, VIP1, VIP2 et calcitonine) allant de 37 à 42% [130].

1.4.2.1 Structure du gène

La structure du PTH2R comprend une séquence signal, une grande extrémité N-terminale extracellulaire contenant six résidus cystéines hautement conservés, plusieurs séquences d'acides aminés très conservés au sein des domaines transmembranaires. Son poids moléculaire varie selon l'état de glycosylation, mais la forme majoritaire retrouvée en Western Blot est de 84 kDa [129]. Malgré les

ressemblances entre les récepteurs PTH1R et PTH2R, ceux-ci sont localisés sur deux chromosomes différents. Chez l'homme, le gène codant PTH2R est sur le chromosome 2, alors que celui codant pour le PTH1R est situé sur le chromosome 3 [99].

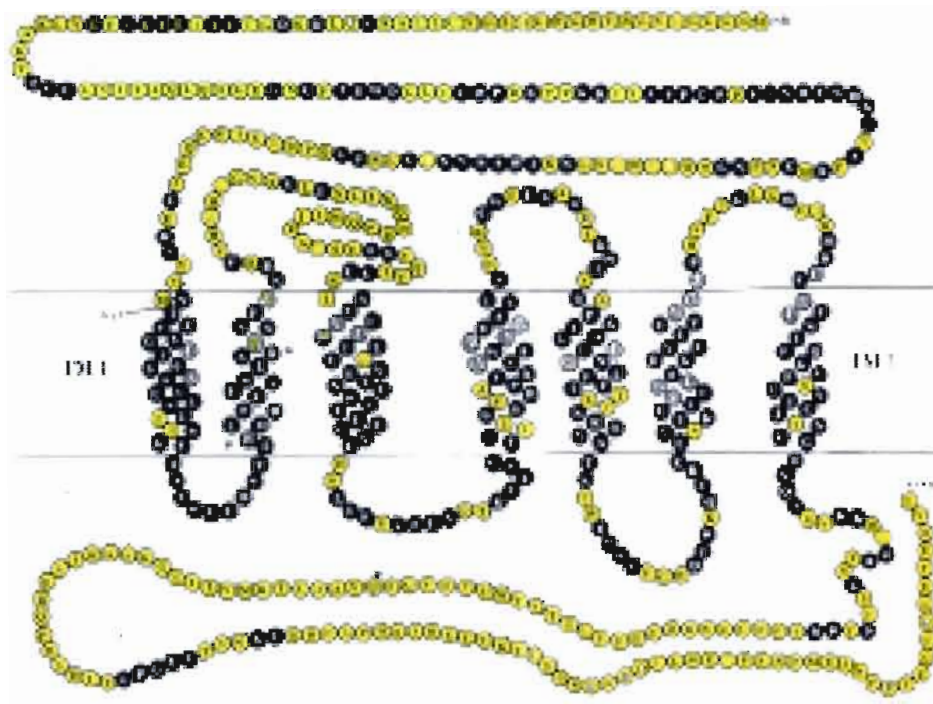


Figure 1-6 : Structure primaire du récepteur PTH2 humain. Le PTH2R est composé de sept hélices transmembranaires (TM 1 à TM 7). Les cercles noirs représentent les acides aminés conservés par rapport à la séquence du PTH1R de l'opossum. Sont également représentés en cercles jaunes, les résidus non conservés entre les PTH1R et les PTH2R. Les cercles gris représentent les acides aminés mutés dans les expériences de Turner et *al.* D'après Turner et *al.*, 1998 [131].

1.4.2.2 Ligands du PTH2R

Contrairement au PTH1R qui lie de façon quasi similaire la PTH et la PTHrP, le PTH2R ne lie que la PTH [132]. La PTH aurait pu être le ligand préférentiel du récepteur PTH2R mais sa taille fait qu'elle est incapable de franchir la barrière hémato-encéphalique [129]. Ces observations ont amené à rechercher un ligand naturel ayant une bonne affinité pour ce récepteur directement dans l'hypothalamus, où l'expression de PTH2R est très élevée.

Un peptide de 39 résidus, dénommé TIP39, présentant peu d'homologie (23%) avec la PTH (1-34) bovine a été découvert. Ce peptide tubéro-infundibulaire se retrouve principalement au niveau du système nerveux et serait donc le ligand endogène préférentiel du PTH2R [133].

1.4.3 Le récepteur à la PTH/PTHrP de type 3 : PTH3R

Un troisième type de récepteur de la PTHrP a été découvert chez le poisson zèbre : le PTH3R [100, 134]. Ce dernier présente plus d'homologie avec le PTH1R qu'avec le PTH2R. Contrairement au PTH2R, le PTH3R ne répond pas au TIP39. Il est activé par la PTHrP (1-36) humaine, et présente vingt fois plus d'affinité pour la PTHrP (1-36) que pour la PTH (1-34). Il s'ensuit une activation de la voie de l'AC mais pas de la PKC. Par contre, son expression chez les mammifères et son activité biologique n'ont pas été démontrées [102].

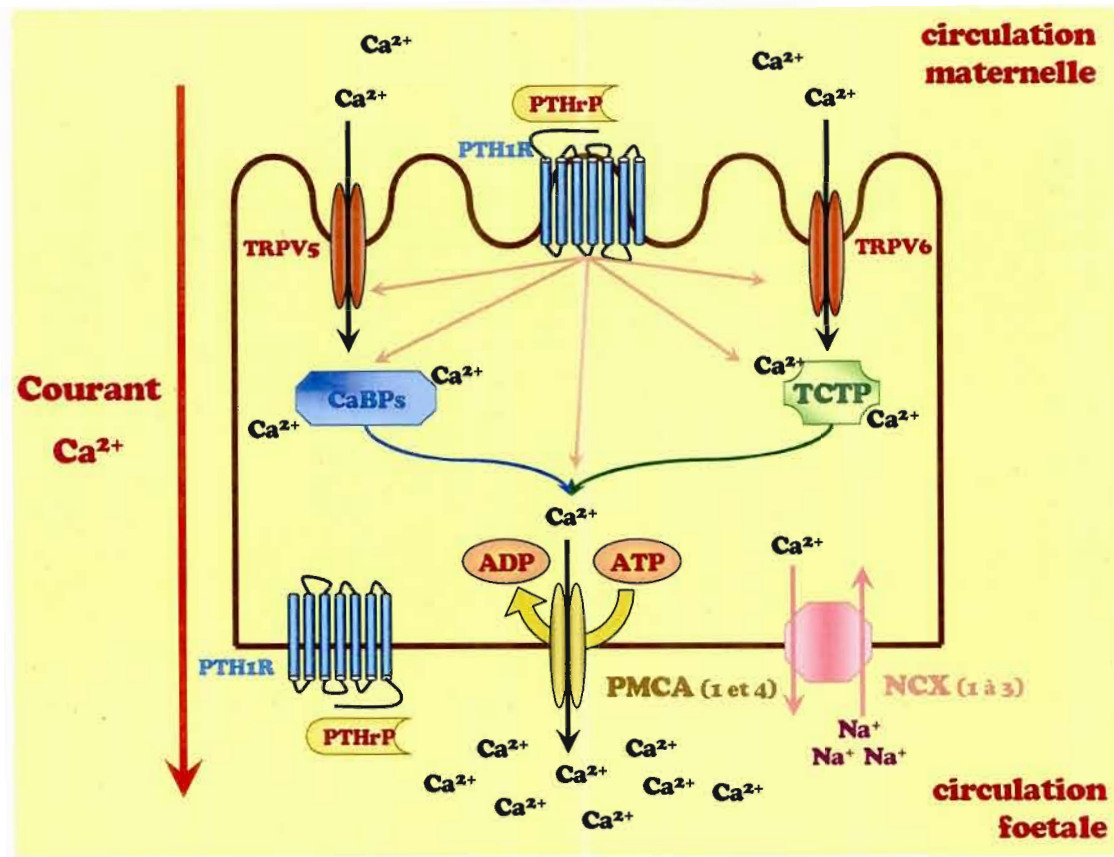


Figure 1-7 : Représentation schématique de protéines intervenant dans le transport calcique au travers d'un syncytiotrophoblaste.

1.5 LES PROTÉINES CALCIQUES

1.5.1 Les canaux TRPV5 et TRPV6

Ces dernières années, une nouvelle famille de canaux calciques, exprimés dans des épithéliums où ils participent au transfert de calcium, a été découverte [135]. Ces deux canaux épithéliaux font partie de la famille des TRPs (transient receptor potential), et plus précisément des TRP-vanilloïde (TRPV). TRPV5 et TRPV6 sont deux membres de cette famille de canaux ayant une forte homologie et leur gène se

juxtaposent au niveau du chromosome humain 7q35, comprenant chacun 15 exons [136, 137]. Le premier à avoir été découvert est TRPV5 au niveau des reins de lapins alors que TRPV6 a été détecté pour la première fois au niveau des petits intestins de rats. Par la suite, ces deux protéines ont été identifiées dans plusieurs autres tissus et espèces [136, 138-140]. Ces deux protéines ont un poids moléculaire d'environ 83 kDa et sont composées de 730 acides aminés. La séquence d'acides aminés de TRPV5 et TRPV6 sont à 76% identiques [141].

Ces canaux sont constitués de six domaines transmembranaires et une région putative formant le pore se situant entre les domaines transmembranaires 5 et 6. Leur structure possède deux longues queues cytosoliques N-terminale et C-terminale contenant des répétitions ankyrin, qui sont des séquences protéiques permettant l'interaction protéine-protéine [142, 143]. Le résidu aspartate D542 pour TRPV5 et D541 pour TRPV6 se trouvant dans la région formant le pore, est déterminant pour la sélectivité de ces canaux au calcium [144, 145]. TRPV5 et TRPV6 peuvent former des complexes tétramériques et hétéromériques [142]

Ces deux canaux représentent la principale voie d'entrée calcique au sein d'un syncytium [146]. Tous deux sont régulés positivement par la vitamine D, c'est-à-dire qu'en absence de cette vitamine, ces deux protéines sont exprimées à de faibles niveaux, rétablis par un traitement à la vitamine D [137, 147-149]. Dans le placenta humain, TRPV6 est bien plus exprimé que TRPV5 (avec un ratio de 1 : 800). Cette même constatation a été faite au niveau des syncytiotrophoblastes [138, 139]. Leurs niveaux d'ARNm augmentent avec l'état de différenciation des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblastes, ce qui va de paire avec l'entrée calcique qui est plus importante lorsque la différenciation des trophoblastes est faite [138, 139]. Tous deux sont co-localisés avec d'autres protéines de transport calcique comme PMCA1b, NCX1, CaBP-28k dans les reins de lapin [150], ce qui suggère que ces deux canaux jouent un rôle clé dans l'entrée calcique au niveau du placenta.

De plus, le niveau d'expression des ARNm de TRPV6 est étroitement corrélé au niveau d'expression des ARNm de PMCA1 dans les biopsies duodénales humaines, ce qui amènerait à penser que l'expression de gènes codant pour des protéines qui contrôlent l'entrée (TRPV6) et la sortie (PMCA1) de calcium est régulée de manière corrélée [151]. Nonobstant, peu de choses sont connues à ce jour sur la régulation de TRPV5 et TRPV6 dans le transport de Ca^{2+} au niveau placentaire. TRPV5 étant largement moins exprimé que TRPV6 au niveau placentaire, et ne trouvant pas d'amorces adaptées à ce gène, seule la protéine TRPV6 a été étudiée.

1.5.2 Les protéines de liaison du calcium

1.5.2.1 Les « calcium binding proteins » : CaBPs

Le Ca^{2+} est un ion essentiel au développement du fœtus mais aussi au bon fonctionnement de l'être humain. Lorsque celui-ci est intracellulaire, il est alors un second messenger capital dans le réseau de signalisation cellulaire. L'homéostasie calcique, durant une grossesse, est gérée par le placenta. Au niveau intracellulaire, cette homéostasie fait appel aux CaBPs qui jouent un rôle de régulation mais aussi de transporteurs calciques afin de ne pas altérer les mécanismes cytosoliques [152]. En effet, son excès dans le cytoplasme pourrait entraîner le déclenchement de voies de signalisation dépendantes du Ca^{2+} .

Les premières CaBPs ont été localisées dans les intestins [153, 154], puis par la suite dans le cerveau [155], les os [156], le pancréas [157], le placenta [158, 159] et les reins [160, 161]. Généralement, ces protéines ont été retrouvées dans le cytosol ou dans les membranes face au cytosol [162]. La famille des CaBPs possède un domaine de liaison du Ca^{2+} avec une forte affinité qui est formé d'un motif hélice-tour-hélice appelé « EF-Hand » [163, 164].

Plusieurs études montrent que l'expression des CaBPs, que ce soit au niveau des ARNm ou des protéines, est influencée par des hormones stéroïdes telles que la vitamine 1,25(OH)₂D₃ [165, 166] ou les oestrogènes [167, 168]. Dans le tissu placentaire, l'expression des CaBPs, aux niveaux de l'ARNm ainsi que protéiques, est sous l'influence de facteurs endocrines, comme la progestérone et l'oestrogène [169-171]. Entre autres, plusieurs équipes rapportent que le transport calcique transplacentaire impliquant les CaBPs serait régulé par la PTHrP [172, 173].

1.5.2.2 La « translationally controlled tumor protein » : TCTP

Le gène *tpt1* code pour la protéine TCTP [174] appelée aussi P23 [175, 176] ou Q23 [177]. Le nom « translationally controlled tumor protein » a été attribué à cette protéine car l'ADNc a été cloné à partir de tumeur humaine et parce que TCTP est régulé au niveau de la traduction [174]. D'abord considérée comme une protéine tumorale, aujourd'hui la TCTP a été retrouvée dans plusieurs types cellulaires normaux et n'est donc plus associée aux cancers [178]. L'analyse de la séquence de TCTP a montré un haut degré de conservation au cours de l'évolution, indiquant que cette protéine pourrait avoir une fonction cellulaire importante [179]. TCTP fait partie des 20 protéines les plus exprimées chez la levure où son expression est fortement augmentée lors de la phase exponentielle de croissance. Ces résultats suggèrent que TCTP pourrait être une protéine impliquée dans la croissance cellulaire [180]. L'analyse de la séquence en acides aminés de TCTP n'a permis d'identifier aucune appartenance à une famille de protéines connues [181]. Ce n'est que l'analyse tridimensionnelle qui a permis d'identifier une homologie structurale avec les protéines Mss4 et Dss4, deux protéines faisant partie de la famille des petites chaperonnes et qui peuvent se lier à la forme "nucléotide-free" des protéines Rab

[179]. Une des premières fonctions biologiques de TCTP à être identifiée, est sa capacité à se lier au calcium. La présence de sites de liaison au Ca^{2+} a été prouvée par Kim et *al.* [182]. Par analyse de séquence, une région de liaison à la tubuline a également été identifiée [183].

La TCTP est présente dans le placenta à partir du premier trimestre et tout au long de la grossesse, plus particulièrement au niveau des villosités trophoblastiques. Elle atteint son niveau d'expression maximale d'ARNm et de protéines lorsque la grossesse arrive à terme, et son inhibition d'expression par la technique des siARN dans la lignée cellulaire HTR-8/SVneo (cellules dérivées de trophoblastes humains) a pour conséquence une diminution d'entrée calcique et de tamponnage du Ca^{2+} intracellulaire [184]. À ce jour, peu d'éléments sont connus sur cette protéine notamment les facteurs pouvant réguler ses niveaux d'expression. La PTHrP et/ou la PTH pourraient également agir sur celle-ci étant donné que la TCTP joue le rôle de protéine liant le Ca^{2+} lors du transfert calcique au sein des cellules trophoblastiques.

1.5.3 La « Plasma Membrane Calcium ATPase »: PMCA

La régulation de l'homéostasie du Ca^{2+} joue un rôle clef dans les fonctions cellulaires. Une grande partie de cette régulation est médiée par un système de pompes calciques ATP-dépendantes localisées au niveau des membranes plasmiques. Dans le placenta humain, où elles sont présentes au niveau des BPM, elles répondent à un besoin en Ca^{2+} du fœtus. En effet, durant le dernier trimestre de la grossesse, environ 140 mg/kg/jour sont transférés via le placenta [6], et les PMCA semblent être le principal système impliqué dans le passage du calcium des syncytiotrophoblastes vers le fœtus.

Cette famille comporte quatre isoformes codées chacune par un gène différent chez les mammifères, PMCA 1 à 4. Les principales différences entre chacune sont les sections N- et C-terminale toutes deux intracellulaires [185, 186]. La première boucle intracellulaire, entre les domaines transmembranaires 2 et 3, contient le domaine de transduction, alors que la seconde, se situant entre les domaines 4 et 5, correspond au domaine catalytique incluant le site de liaison à l'ATP. La partie C-terminale englobe le plus important domaine de régulation des PMCA [187-189]. Elles possèdent également un site de régulation sensible à la calmoduline [190] aussi auto-inhibiteur en cas de faible concentration calcique cytosolique [191].

Les PMCA 1 et 4 sont ubiquitaires alors que les PMCA 2 et 3 sont retrouvées dans des tissus plus spécifiques : PMCA2 se retrouve exprimé dans le cervelet et dans le cortex cérébral alors que PMCA3 est présent dans les plexus choroïdes [192]. De plus, l'expression des PMCA2 et PMCA3 pourrait être impliquée dans un processus de développement et de différenciation, et la régulation des isoformes PMCA pourrait être cruciale pour la survie cellulaire [193]. Différents modèles animaux déficients pour la PMCA ont été effectués : la majorité des modèles étaient viables malgré des symptômes plus ou moins importants, mais lorsque c'est la PMCA1 qui est déficiente une létalité embryonnaire est observée [194-196].

Dans le placenta humain, la PMCA intervient dans l'échange calcique existant entre la mère et le fœtus, plus précisément dans le passage du calcium présent dans le cytosol syncytiotrophoblastique vers la circulation fœtale. Elle est donc située dans la BPM du syncytium et maintient la concentration calcique cytosolique [8, 48, 197, 198]. Les PMCA 1 et 4 sont les isoformes les plus abondantes dans le placenta humain [197, 199]. Les PMCA 2 et 3 sont également présentes dans le placenta mais en quantité moindre vis-à-vis des PMCA 1 et 4 [193]. Ces deux dernières sont exprimées de façon plus importante dans le second et le troisième trimestre de la grossesse, sans modulation d'expression entre les semaines 32 et 42 de grossesse.

Cependant, l'activité de ces pompes augmente de façon linéaire tout au long de la gestation traduisant le besoin grandissant de calcium pour la croissance osseuse du fœtus [197, 199]. En 1991, Lafond *et al.* ont observé que l'ATP stimule l'incorporation de Ca^{2+} dans des BPM purifiées inversées de placenta humain [8]. De plus, Strid *et al.* (2002) ont montré que le fragment (38-94) de la PTHrP stimule la PMCA avec un effet dose-dépendent alors que le fragment (1-34) de la PTHrP stimule seulement à des concentrations trop élevées physiologiquement [200].

1.5.4 L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$: NCX

L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, en parallèle du système des pompes calciques PMCA, joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie calcique intracellulaire [201, 202].

L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ est un antipore électrogène, qui permet le transport de trois ions Na^+ dans un sens en échange d'un ion Ca^{2+} dans le sens opposé [203]. La direction de l'échange dépend du gradient électrochimique transmembranaire des deux espèces d'ions transportées, l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ne consommant pas d'ATP. Les gradients électrochimiques physiologiques entraînent l'entrée de Na^+ à partir du compartiment extracellulaire, et l'extrusion de Ca^{2+} intracellulaire. Mais dans certains cas, cet échangeur pourrait être en faveur de l'influx calcique et non l'inverse [204].

Chez les mammifères, les isoformes de l'échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ sont codées par trois gènes : NCX1 [205, 206], NCX2 [207] et NCX3 [208]. La séquence en acides aminés de ces trois isoformes présente 70% d'homologie, et leur topologie est similaire, à savoir la présence de 11 domaines putatifs transmembranaires et une grande boucle centrale hydrophile entre les domaines transmembranaires 5 et 6, aussi appelée boucle *f* [205]. C'est dans cette boucle que le domaine régulant la liaison du calcium serait présent [209]. De plus, le gène codant pour NCX1 est caractérisé par six exons

(A à F) codant pour une région variable dans la section C-terminale de cette grande boucle intracellulaire. Un épissage alternatif de ces exons génère plusieurs variantes spécifiques au tissu de NCX1 et NCX3 [210-212].

L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ est constitué de 9 segments transmembranaires séparés en deux groupes (5 du côté N-terminal et 4 du côté C-terminal) par une large boucle intracellulaire [213]. Les trois isoformes présentent des motifs répétés, de leur nom anglophone α - et β -repeat. Le motif β -repeat est situé sur la boucle cytoplasmique alors que l' α -repeat est constitué de deux séquences très conservées, situées au niveau des segments transmembranaires, et qui interagissent dans la structure tertiaire de la protéine et est impliqué dans la liaison et le transport de l'ion. [214].

Dans les ostéoblastes, la protéine NCX1 est activée par la PTHrP par la voie de signalisation dépendante de l'AMPc [215]. Dans le placenta humain, l'échangeur d'ions NCX est présent et son activité a été étudiée et notamment le rôle qu'il joue au niveau de l'homéostasie calcique intracellulaire [8, 216-219]. Dans un placenta à terme, le NCX est localisé spécifiquement au niveau des BPM. Cependant, son rôle dans les échanges calciques transplacentaires est toujours sujet au débat.

D'après Williams *et al.* (1991), NCX ne contribuerait pas de façon significative dans le mouvement transplacentaire du calcium, c'est-à-dire de la circulation maternelle vers la circulation fœtale. En revanche, il serait associé à la pompe calcique PMCA, ce qui serait confirmé par l'étude de vésicules de BPM purifiées de syncytiotrophoblastes de placenta humain à terme [8]. Des études de flux calcique en milieu dépourvu de sodium indiquent que NCX joue un rôle minime dans les flux calciques cellulaires [220]. Des résultats similaires ont été obtenus dans les cellules de choriocarcinome humain, les BeWo [218]. L'ensemble de ces résultats tend à confirmer que l'échangeur NCX pourrait être impliqué dans l'établissement de la vascularisation placentaire plutôt que dans le transfert transplacentaire de calcium. En revanche, peu d'éléments sont connus à ce jour en ce qui a trait aux liens existant

entre PTH1R et les protéines de transport calciques comme TRPV6 , PMCA, TCTP,
NCX...

1.6 BUTS DU PROJET

Le transport du Ca^{2+} au travers des syncytiotrophoblastes est d'une importance capitale pour le bon développement du fœtus. Afin de mieux comprendre le fonctionnement de ce transfert calcique, il est important d'étudier la régulation d'expression de ces protéines impliquées dans ce transport calcique. De plus, en dépit de l'abondance de littérature sur les actions de la PTH et la PTHrP, l'influence de ces deux hormones, notamment via le PTH1R, sur le transfert de calcium durant la grossesse demeure obscure. Actuellement, nous savons qu'une diminution du niveau de PTHrP réduit considérablement l'expression de gènes des transporteurs de Ca^{2+} . Par conséquent, cette diminution de gènes se traduirait par une baisse du transport de calcium et donc, un apport calcique déficient pour le fœtus. De plus, il est connu que la PTH intervient dans le développement du fœtus, notamment en observant les cas d'hyper- ou d'hypoparathyroïdie. En effet, une hypocalcémie chez la mère, par exemple, entraîne, chez le fœtus, une hypertrophie de la glande parathyroïde entraînant, entre autres, une augmentation de PTH dans le sang, ainsi qu'une déminéralisation de ses os. Cependant, le récepteur véhiculant les actions de ces deux hormones calciques n'est pas encore clairement défini. Ce projet vise donc à apporter plus d'informations quant au rôle de la signalisation véhiculée par le PTH1R sur les niveaux d'expression de différentes protéines calciques, qui seraient corrélés à la PTH et/ou la PTHrP.

1.7 HYPOTHÈSES DE TRAVAIL

Ainsi, les hypothèses de ce projet seront les suivantes :

La PTHrP, connu pour être un facteur hypercalcémiant, est l'hormone maintenant le gradient calcique allant de la circulation maternelle vers la circulation fœtale. Pour maintenir ce flux calcique, la PTHrP agit via le PTH1R. La PTH, elle aussi une hormone hypercalcémiant, a un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie calcique, tant plasmatique qu'interstitielle, durant la grossesse.

- 1) Si ces deux hormones calciques, dont leurs peptides PTH (1-34) et PTHrP (1-36) se lient au PTH1R, voient leurs actions inhibées via ce récepteur, on s'attendrait à observer une diminution du flux calcique.
- 2) Une réduction du transfert calcique se traduirait alors par une diminution des niveaux d'expression des ARNm de protéines impliquées dans le transport calcique.
- 3) Ceci signifierait donc que la PTH et/ou la PTHrP réguleraient directement l'expression des protéines calciques.

2 CHAPITRE 2

ARTICLE SCIENTIFIQUE

2.1 CONTRIBUTIONS

Titre de l'article:

INFLUENCE OF THE PTH/PTHRP RECEPTOR (PTH1R) ANTAGONIST: PTH (7-34) ON THE LEVEL OF mRNA EXPRESSION OF PROTEINS INVOLVED IN CALCIUM TRANSPORT TRANSPLACENTAL.

Auteure principale: Mathilde RIOLS

Collaboratrice : F. Le Bellego

Directrice de recherche : J. Lafond

L'article suivant a été rédigé dans sa totalité par moi-même, Mathilde RIOLS. La réalisation des expériences ainsi que les tests statistiques en découlant ont aussi été réalisés par moi-même.

L'article suivant est présenté sous la forme exigée par l'université.

2.2 *ARTICLE SCIENTIFIQUE*

**INFLUENCE OF THE PTH/PTHrP RECEPTOR (PTH1R)
ANTAGONIST: PTH (7-34) ON THE LEVEL OF mRNA
EXPRESSION OF PROTEINS INVOLVED IN CALCIUM
TRANSPORT TRANSPLACENTAL.**

M. Riols^{1,2}, F. Le Bellego^{1,2} and J. Lafond^{1,2,3}

¹Laboratoire de Physiologie Materno-Fœtale, Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8, ²Centre de recherche BioMed, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8.

³To whom correspondence should be addressed:

Julie Lafond PhD

Laboratoire de Physiologie Materno-Fœtale

Centre de Recherche BioMed

Université du Québec à Montréal, Département des Sciences biologiques

C.P. 8888, Succursale Centre-ville; Montréal, Canada H3C 3P8

Fax: (514) 987 4647

Email: lafond.julie@uqam.ca

Key words: Placenta, calcium, PTH1R, PTH/PTHrP, PTH (7-34), TRPV6, TCTP, PMCA1, PMCA4, NCX1, NCX2, NCX3

Manuscript submitted to **PLACENTA** (March, 2008)

ABSTRACT

Calcium (Ca^{2+}) is an essential ion for the fetal development. During pregnancy, 30g of Ca^{2+} are transported from the mother to the fetus via the placenta, at the rate of 140 mg/kg/day during the third trimester. This ion diffuses passively through the brush border membrane (BBM) of syncytiotrophoblast via channels, like transient receptor potential vanilloid (TRPV6), it is then buffered by the Ca^{2+} calbindin protein, like the translationally controlled tumor protein (TCTP), in order to be transported to the basal membrane plasma (BPM). To be extruded to the fetal circulation, Ca^{2+} requires an active transfer via ATPase Ca^{2+} pumps, like plasma membrane Ca^{2+} ATPase (PMCA1 and PMCA4). It is also possible that $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchangers (NCX) are involved. The parathyroid hormone receptor 1 (PTH1R) mediates the paracrine actions of parathyroid hormone-related peptide (PTHrP), which plays a vital role in maintaining the maternal–fetal Ca^{2+} concentration gradient. On the other hand, parathyroid hormone (PTH), considered as another hypercalcemic factor, would be implicated in the maintenance of the mother's Ca^{2+} equilibrium. In the present study, we used syncytiotrophoblast-like carcinoma cell line (JEG-3) to observe the influence of PTH1R antagonist: PTH (7-34) on regulation of mRNA level expression of proteins involved in Ca^{2+} transport. Our results show that an inhibition of PTH1R during 4 days leads to a significant diminution of NCX mRNA level expression, and a significant augmentation of transient receptor potential vanilloid (TRPV6) mRNA, while Ca^{2+} uptake activity is increased. On day 2, a slight decrease of protein mRNA levels expression is observed while Ca^{2+} transport seems to be affected only on the initial velocity, meaning an alteration of cells capacity to transfer Ca^{2+} , especially Ca^{2+} entry. Also, plateau values stay unchanged. Taken together, our data suggest that PTH/PTHrP actions via PTH1R do not play a key role in regulating the mRNA level expression of proteins involved in placenta Ca^{2+} transport.

INTRODUCTION

During human pregnancy, the fetus is connected to the mother by a transitory organ: the placenta. This organ, specific to mammals, allows the fetus to develop within the protective maternal organism. The nutrients for the growth of the fetus come from both maternal diet and circulation. The ability of nutrients to permeate the placenta and the placenta's ability to facilitate this transfer is an important factor for the development of a healthy fetus.

Fetal Ca^{2+} needs are specific and different from adult needs, and vary throughout pregnancy [1]. The human fetus depends on placental Ca^{2+} transfer for his growth and development. Ca^{2+} is essential for bone formation and for the maintenance of cellular homeostasis and functions. During the third trimester of pregnancy, Ca^{2+} is actively transported across the human placenta since it is maintained hypercalcemic relative to its mother. The high rate of 140 mg/kg/day allows to store up about 80% of total fetal Ca^{2+} [2]. Thus, there is a maternal-fetal Ca^{2+} gradient that is maintained by the presence of parathyroid hormone-related peptide (PTHrP), which is also implicated in uterine contraction and fetal tissue development [3, 4], with a concentration 1000-fold higher in the cytoplasm of the syncytiotrophoblasts than in the maternal circulation [5]. It is also implicated in cytoplasmic binding process that regulates the concentration of the free intracellular ion. In trophoblasts, Ca^{2+} binding proteins seem to play this role of buffer [6]. Since Ca^{2+} plays a key role in intracellular signalling of all mammalian cells, a tight control of intracellular Ca^{2+} is fundamental [7].

PTH and PTHrP play distinct biological roles. These two hormones act through the same G protein-coupled receptor, the PTH/PTHrP receptor of type I (PTH1R). In mammals, PTH is an important regulator of Ca^{2+} ion homeostasis [8, 9]. PTH is secreted in the circulation by the thyroid in response to low blood Ca^{2+} levels. It then

acts on target cells in kidney and bone where it binds to cells expressing PTH1R, in particular PTH (1-34). The action of this hormone on these target cells helps to maintain blood Ca^{2+} concentrations into narrow limits, even though this process is direct or not. PTH (1-31) activates only cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A (cAMP-PKA) with no effects on phospholipase C/protein kinase C (PLC-PKC) [10, 11]. Furthermore, N-terminally truncated PTH analogs, PTH (3-34) and PTH (7-34) do not stimulate cAMP production [12, 13]. PTH (1-34) increases bone mineral density and bone strength in humans, and is the most effective treatment for osteoporosis [14]. Also, PTH, derived from maternal circulation, could not pass through the placenta [15], and during the gestation in mammals, fetal immunoreactive PTH levels are low [16, 17].

PTHrP is considered to be a paracrine/autocrine factor, which regulates cell proliferation and differentiation programs in developing tissues [18]. PTHrP is produced almost throughout pregnancy. This hormone is present in maternal and fetal circulation, and comes from both parts [19]. In sheep, thyroid hormone replacement when fetus has a thyroparathyroidectomy decreases fetal blood Ca^{2+} and abolishes the maternal-fetal Ca^{2+} gradient [20]. Likewise, in pregnant mice knockout for PTHrP gene, there is an inversion of the Ca^{2+} gradient [21]. Infusion of PTH or PTHrP (1-34) into fetal circulation does not restore the gradient or correct the fetal hypocalcemia ([22]. In contrast, injection of PTHrP, that includes the mid-region residues 35-86 like PTHrP (1-86), (1-108), or (1-141), re-establishes the placental Ca^{2+} gradient. It suggests that mid-regions of PTHrP establish and maintain maternal-fetal Ca^{2+} gradient. Finally, the injection of mid-region peptides PTHrP(67-86) or PTHrP(75-86) directly into fetal circulation also stimulates placental Ca^{2+} transport [23]. So, PTHrP has a real importance in fetal Ca^{2+} homeostasis and in placental Ca^{2+} transport and unambiguously establish the importance of mid-region PTHrP in mediating this process.

PTHrP binds to the same receptor as PTH, namely PTH1R, and the biological responses induced by either PTHrP or PTH via this common receptor are not distinguishable, at least with regard to mineral ion homeostasis [24-27]. For these bindings, only amino-terminal (1-34) peptide fragments are required. Indeed PTH-(1-34) and PTHrP-(1-34) show high-affinity receptor binding and efficient receptor activation, whereas mid-regional or carboxyterminal portions of the intact ligands would not interact with the receptor [28-30]. Cells expressing the PTH1R stimulated by PTH-(1-34) or PTHrP-(1-34) agonist ligands can activate at least two second messenger signalling pathways: the adenylate cycles/protein kinase A (AC/PKA) pathway and the PLC/PKC pathway [9, 31]. To date, the link between PTH1R and Ca^{2+} proteins is unknown but PTH1R represents a possible important candidate for pharmacological interventions to treat disorders of mineral ion homeostasis and skeleton.

TRPV6 is a channel on the brush border membrane (BBM) of syncytiotrophoblast that allows ion to diffuse passively through the membrane. In trophoblast cells culture from human term placenta, transient receptor potential vanilloid (Ca^{2+} transporter-1) (TRPV6 or CaT1) mRNA abundance gets to a maximum between days 2 and 3 of culture, it is time-dependant, and correlates with Ca^{2+} uptake in trophoblasts [32]. *In vivo*, TRPV6 expression level is much higher in human placenta than in kidney and small intestine. This higher TRPV6 placental expression is correlated to transplacental Ca^{2+} transport, which is crucial for normal fetal growth and development [33]. In placental tissue, by quantitative real-time PCR, both type of Ca^{2+} channels (TRPV6 and TRPV5) are expressed and TRPV6 is highly expressed compare to TRPV5, with a ratio of 800 [33]. In human placenta, little is known about the regulation of TRPV6 with respect to Ca^{2+} transport. Nevertheless, some studies showed that $1,25(OH)_2D_3$ and PTH regulate TRPV6 expression directly [34].

The translationally controlled tumor protein (TCTP) was initially considered as a tumor protein, but after its expression was found in several normal cells and tissues, it became clear that TCTP is not an exclusive feature of cancer cells [35]. TCTP is implicated in multiple biological processes but to date its physiological functions are poorly characterized. A Ca^{2+} -binding activity of TCTP in mammalian and invertebrates has been described by several reports [35-39]. This protein has a Ca^{2+} -binding site showing up a lack of sequence homology with other known families of Ca^{2+} -binding proteins [40]. Even if Ca^{2+} regulates transcriptional and posttranscriptional levels of TCTP [36] many characteristics of this protein remain unknown.

The efflux of cytosolic Ca^{2+} from the cell is mediated by plasma membrane Ca^{2+} ATPase (PMCA)[41] which plays an important role in the maintenance of low free Ca^{2+} concentration in the cytoplasm. Its activity is Ca^{2+} dependent and is mediated by calmodulin. PMCA is coded by four separate genes (PMCA 1-4), and owing to random splicing, more than 20 variants can exist [42]. PMCA 1 and 4 isoforms are ubiquitous, whereas PMCA 2 and 3 are found in more specialized cell types. The differences among splice variants involve modifications in their regulatory regions; thus, the isoform and the membrane composition determine the modulation of PMCA activity [42]. PCMA mRNAs of genes 1 and 4 are present almost in all tissues whereas the transcripts of genes 2 and 3 are highly expressed in specific tissues, like fetal skeletal muscle and brain [43]. PMCA participates in ATP-dependent Ca^{2+} transport through trophoblasts [44]. PMCA mRNA from both PMCA1 and PMCA4 are expressed in the same amount in placenta during second and third trimester of pregnancy [45]. The activity of these pumps increases linearly during gestation, correlating with the growing fetus, i.e. Ca^{2+} needs for bone mineralization [46]. In addition, PMCA activity is modulated by PTHrP, particularly by PTHrP (38-94),

which stimulates ATP-dependent Ca^{2+} transport. Finally, PTHrP (1-34) stimulates only at supraphysiological concentrations [47].

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Exchanger (NCX) may mediate Ca^{2+} influx even if its main role is to extract Ca^{2+} from cells [48]. Plasma membrane NCX plays an important role, in concert with PMCA, in the maintenance of intracellular Ca^{2+} homeostasis. NCX has a low affinity but it is a high capacity Ca^{2+} translocating molecule [49, 50]. Three mammalian isoforms of NCX have been cloned: NCX1 [51-53], NCX2 [53] and NCX3 [54].

In placenta, NCX may play a major role in regulating intracellular Ca^{2+} , important for the physiological mechanism of the cell, and in transsyncytial transfer. NCX is expressed in BPM but not in BBM [55]. Under basal conditions, NCX does not have a major role in Ca^{2+} efflux [56]. However, NCX seems to have a minimal role in transplacental movement of Ca^{2+} from the mother to the fetus, which has been observed with perfusion of placental lobules [57]. Therefore, NCXs seems to likely affect cells subject to large variations of intracellular Ca^{2+} levels [56], while the expression of NCX might be influenced by PTH, as observed in kidney [58].

This study, realized on JEG-3 cells, reports data on cell expression and characterization of human placental TRPV6, TCTP, PMCA1, PMCA4, NCX1, NCX2 and NCX3 during 4 days of treatment with PTH (7-34), an antagonist of PTH1R. The effect of PTH (7-34) on Ca^{2+} transport has been also evaluated. The results are discussed in regards of potential roles of PTH and PTHrP via PTH1R in placental Ca^{2+} transport.

MATERIELS AND METHODS

Cell culture

The JEG-3 cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, USA). They were grown in a complete culture medium constituted of minimum essential medium (MEM) (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada) without Ca^{2+} chloride, magnesium sulfate and sodium bicarbonate, supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Medicorp, Montreal, Canada) and penicillin (Sigma) streptomycin (Amresco, Solon, USA), and maintained at 37°C in 5% CO_2 in air. At confluence, cells were detached from flasks using 0.25% trypsin-EDTA mixture (Sigma, Canada) and seeded in a complete medium, at a density of 30 000 cells/well in 24-well dishes for 1 day before treatments for Ca^{2+} uptake studies, and at a density of 300 000 cells/well in 6-well dishes for 1 day before treatments for RNA isolation. One day after both split, cells were treated with PTH (7-34) (Bachem, Torrance, USA). Briefly, PTH (7-34) was added to the medium and renewed every day of culture, with different concentrations of antagonist: 10^{-13} M, 10^{-11} M, 10^{-9} M, 10^{-7} M or without, as control. Cells were collected after 2 or 4 days of culture with treatment.

Calcium (Ca^{2+}) Uptake Studies

Ca^{2+} uptake studies were performed on trophoblasts after 2 or 4 days of culture with treatment. Briefly, cells were washed twice with the Ca^{2+} uptake buffer (HBSS containing 1.26 mM CaCl_2 , 10 mM HEPES, and 0.1% BSA, and allowed to equilibrate in the same buffer (250 μl) for 10 min. Thereafter, cells were incubated at 37°C in a water bath for different intervals of time (0.25-30 min.) following the addition of 250 μl of uptake buffer containing $^{45}\text{CaCl}_2$ (5 $\mu\text{Ci/well}$). The incubation was stopped by aspirating the uptake buffer. The cells were washed three times with 1 ml of ice-cold PBS containing 4 mM EGTA (to eliminate the non-specific component of the uptake according to a procedure reported previously [59]) and then solubilized in 0.5 M

NaOH. The cell-associated radioactivity was measured by β -scintillation. The cellular protein content of each well was evaluated by spectrophotometric quantification using BCA reagent with BSA as standard. In the present study, Ca^{2+} uptake is expressed as *nmole* of Ca^{2+} (from specific activity) per mg of cellular proteins. Results were obtained from 4 different cells culture in duplicate.

RNA isolation, reverse transcription and real-time PCR amplification

Total RNA was isolated from trophoblast cells (day 2 and day 4 after treatment) using RNeasy[®] Plus Mini kit (Qiagen, Mississauga, ONT, Canada) following manufacturer's instructions. After RNA isolation, 2 μg was reverse transcribed into cDNA at 37°C for 1h using the Omniscript[®] Reverse Transcriptase kit (Qiagen) with 10 μM random poly(dT) (Roche, Laval, QC, Canada) in a 20 μl final volume. The real-time PCR reactions (LightCycler[®] 480, Roche) were performed in presence of 0.5 μM of each primer (Table 2-1) according to the manufacturer's instructions (LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master, Roche). A negative control without cDNA was carried out for each set of reaction. All primer sequences were generated using LightCycler Probe Design Software 2.0 (Roche) and checked for specificity using BLAST analysis. Primers were designed for TRPV6, TCTP, PMCA1, PMCA4, NCX1, NCX2 and NCX3. Amplification of d-glucose-6-phosphatedehydrogenase (G6PDH) cDNA was used as an internal control to quantify the expression of a given gene in real-time PCRs. For quantification studies, dissociation curves were run on all reactions to ensure amplification of a single product with the appropriate melting temperature (data not shown) and to be used in quantification.

Statistical analysis

The relative difference in levels of gene expression, compare to control conditions, was determined to be significant by unpaired t-test analysis ($p < 0.05$). Statistical analyses for the kinetic of Ca^{2+} uptakes were performed using a nonlinear regression model test, and an unpaired t-test was done to observe significant differences between control and treated conditions.

RESULTS

Ca²⁺ Uptake Studies

The Ca²⁺ uptake experiments on syncytiotrophoblast carcinoma cells line were performed at (A) day 2 and (B) day 4 of treatment with PTH (7-34) or without treatment (control). Ca²⁺ uptake by JEG-3, for all conditions of treatment, is presented in Figure 2-1 and Table 2-2. The initial velocity (Vi) of Ca²⁺ uptake was calculated on short times (15-60 sec.). On day 2, Vi is maximal in control condition and significantly different compare to the Vi of cells treated with 10⁻⁷ M of PTH (7-34) (p= 0.0043), while on day 4, no significant difference for the Vi is observed between conditions. The plateau obtained in Ca²⁺ uptake studies correlates with the equilibrium created between cellular Ca²⁺ influx and efflux. After 2 days of cell culture, the plateau is observed at 8.92.01 ± 0.88 nmol Ca²⁺/mg protein for control cells, and is obtained at 10.72 ± 0.94 nmol Ca²⁺/mg protein and 7.56 ± 0.92 nmol Ca²⁺/mg protein for cells treated with 10⁻⁹ M and 10⁻⁷ M of PTH (7-34) respectively. After 4 days of cell culture with treatment or not, the plateau is 7.67 ± 0.63 nmol Ca²⁺/mg protein for control conditions, 11.57 ± 1.24 nmol Ca²⁺/mg protein, and 10.38 ± 0.77 nmol Ca²⁺/mg protein with a concentration of 10⁻⁹ M and 10⁻⁷ M of PTH1R antagonist respectively. Also on day 4, we observe a significant difference between treated cells and control ones for both concentration of PTH (7-34) (p= 0.0109 with 10⁻⁹ M of PTH (7-34), and p= 0.0111 for 10⁻⁷ M of PTH (7-34)).

Effect of PTH (7-34) on the mRNA expression of Ca²⁺ binding proteins in JEG-3 cells.

The effects of PTH (7-34), a PTH1R antagonist, on the expression level of mRNA of different Ca²⁺ binding proteins in JEG-3 were further examined after 2 (A) and 4 days (B) of treatment.

mRNA expression of TRPV6

In JEG-3 cells, treatment with PTH (7-34) results in a decrease of TRPV6 mRNA expression level after 2 days (A) following a treatment at 10⁻¹¹ M and 10⁻⁹ M renewed every day (p= 0.0052 and p=0.0381, respectively). An increased level of TRPV6 mRNA expression level is observed after 4 days (B) of treatment at 10⁻¹³ M, 10⁻¹¹ M, 10⁻⁹ M (p= 0.0021, p= 0.0436, p= 0.0136), while a slightly reduced mRNA expression is obtained at 10⁻⁷ M compared to control (p= 0.0139) as seen in Figure 2-2.

mRNA expression of TCTP

After 2 days of treatment (A), TCTP mRNA expression remains unchanged for all conditions except for a concentration of 10⁻¹¹ M of PTH (7-34) where a decrease is noted (p= 0.0025)(Fig.2-3A). A slight increase is seen after 4 days of treatment with 10⁻¹³ M (p= 0.0200), however cells treated at 10⁻¹¹ M of antagonist show anymore difference with control cells (Fig. 2-3B).

mRNA expression of PMCA1

Expression level of PMCA1 mRNA seems to be decreased after 2 days of treatment, but this decrease is significant only with a treatment with PTH (7-34) at concentrations 10⁻¹¹ M and 10⁻⁷ M (Fig.2-4A). On day 4, no significant modification of PMCA1 mRNA expression is obtained for any treated cells compare to control cells (Fig. 2-4B).

mRNA expression of PMCA4

On day 2 (A) and 4 (B), there is no significant difference between expression of PMCA4 in treated cells and control cells. However, a trend to decreased expression after 2 days of treatment, and a trend to increased after 4 days of treatment are observable (Fig 2-5 A and B).

mRNA expression of NCX1

After 2 days of treatment, cells show a decrease of expression level of NCX1 at strong concentrations of PTH1R antagonist, that is to say 10^{-9} M ($p < 0.0001$) and 10^{-7} M ($p = 0.0415$)(Fig.2-6A). Nevertheless, on day 4, a significant decrease of expression is discernible, and that all concentrations of PTH (7-34) ($p < 0.0001$ for all treated conditions; Fig. 2-6B).

mRNA expression of NCX2

NCX2 expression is decreased after 2 days of treatment only at concentration 10^{-11} M ($p = 0.0051$)(Fig.2-7A). Other conditions don't show difference with control condition. By contrast on day 2, after 4 days to treatment with antagonist, like expression of NCX1, we can see a significant decrease for all concentrations with $p < 0.001$ (Fig. 2-7B).

mRNA expression of NCX3

In parallel with NCX1, the expression level of NCX3 mRNA, after 2 days, is decreased in presence of PTH (7-34) at concentrations 10^{-9} M and 10^{-7} M ($p = 0.0290$ and $p = 0.0460$, respectively) (Fig. 2-8A). And on day 4, like NCX1 and NCX2, there is a significant decrease of expression of NCX3 for each of the concentrations of PTH1R antagonist ($p < 0.0001$ at 10^{-13} M and 10^{-9} M, $p = 0.0173$ at 10^{-11} M, and $p = 0.0041$ at 10^{-7} M (Fig. 2-8B).

DISCUSSION

The syncytiotrophoblast cell represents the primary interface between the maternal and fetal circulations in the placenta. The transfer of Ca^{2+} through the placental syncytiotrophoblast, from the mother to the fetus, results in an accumulation of Ca^{2+} in the fetal circulation. The initial step of placental Ca^{2+} transport involves the influx from the maternal blood into the cytosolic compartment of the trophoblast cell, across the placental microvillous membrane. Once in the cytosol, Ca^{2+} is translocated through the trophoblast cell cytosol from BBM to BPM. Ca^{2+} is transferred across the BPM into the fetal circulation by an ATP-dependent mechanism.

The first step of Ca^{2+} influx proceeds along favorable chemical and electrochemical potentials, likely through Ca^{2+} channels like TRPV6 located on BBM [60]. In the cell cytosol, Ca^{2+} travels from BBM to BPM being linked to calbindin which TCTP would be part [61]. On the fetal side, an ATP-dependent Ca^{2+} transport system is required involving pumps PMCA to move Ca^{2+} into the fetal circulation. At this stage, the role of NCX exchangers remains unclear [4]. Currently little is known about the functional roles of the PTHrP on the Ca^{2+} transport through human trophoblasts.

There is a presence of responsive PTH/ PTHrP receptors in the human placenta, and specifically on the BMs of the syncytiotrophoblast [62-64]. Furthermore, we know that PTH (1-34) and PTHrP (1-34) regulate Ca^{2+} transport across the BM of the syncytiotrophoblast. Furthermore, some studies demonstrated that the PTH/PTHrP receptor antagonist, PTHrP (7-34), which looks like PTH (7-34), antagonized the Ca^{2+} efflux from BMs in response to both PTH(1-34) and PTHrP(1-34), indicating a receptor-mediated event [65]. So, these experiments indicate a potential role of N-terminal PTH and PTHrP in stimulating human placental Ca^{2+} transport.

The only characterized receptor for PTHrP is PTH1R [66]. PTHrP-(1–34) and PTH-(1–34) bind to and stimulate this receptor quasi-identically. Another receptor specific for PTH has recently been identified and cloned: PTH2R [67], but, up till now no specific PTHrP receptors have been identified. PTH1R might be a good candidate for that PTHrP acts on placental Ca^{2+} transport. However, in mice fetuses homozygous for deletion of the PTHrP, placental Ca^{2+} transport is not increase by PTHrP (1–34) and PTH (1–34). Furthermore, PTHrP-(67–86), which is not known to activate PTH1R, stimulate placental Ca^{2+} transport, so it was anticipated that placental Ca^{2+} transport might be unaffected by deletion of PTH1R gene. In the mice homozygous, PTH/PTHrP receptor gene-deleted fetuses, relative Ca^{2+} transport is increased. PTHrP may have up-regulated placental Ca^{2+} transport, possibly in response to the fetal hypocalcemia. By deduction, the stimulation of placental Ca^{2+} transport by PTHrP would be not mediated by the PTH/PTHrP receptor [21].

In human placenta, little is known about the regulation of TRPV6 with respect to Ca^{2+} transport. TRPV6 expression in the kidney is regulated directly by 1,25(OH), and PTH also up-regulates TRPV6 expression [34]. In our experiments, on Day 2, we can observe that the expression level of TRPV6 mRNA is slightly reduced, whereas on Day 4 it is increased. We might therefore think that in absence signalling via the receptor PTH1R, it would be a decrease of TRPV6 expression inducing a slender hypocalcemia, which would be compensated on Day 4 by a over-expression. This compensative response would be not signalled by PTH1R inhibited by PTH (7-34), but by a second pathway.

TCTP and the two PMCA mRNA seem to be regulated in the same way that TRPV6 mRNA but not significantly, that is to say, a trend to decrease of level expression of mRNA on Day 2, and after 4 days of treatment, a trend to increase.

Regulation of protein TCTP is still unknown. The downregulation of this protein using siRNA induce a cellular alteration of Ca^{2+} uptake activity and binding capacity in HTR-8/SVneo cell line [61]. TCTP is a protein likely to participate in Ca^{2+} Ca^{2+} transport through trophoblasts as calbindin [40, 61]. However, according to Hershberger and *al.*, neither PTH (1-34) nor PTHrP (1-34) is able to stimulate placental transfer of Ca^{2+} , but PTHrP of at least 84 amino acids in length is active and it seems that the mid-portion of the molecule (34-86) may be the active part of protein. The expression of CaBP is stimulated by the mid-portion of PTHrP and the latter increase Ca^{2+} uptake in Rcho-1 cells, while neither PTHrP (1-34) nor PTH (1-34) had any effect [68]. So, we can say that PTHrP stimulated expression of CaBP as well as Ca^{2+} transport but regulation of calbindin would not happen primarily by the PTH1R since this receptor involves the fragment (1-34) of PTHrP.

PMCA activity is modulated by PTHrP, which is known to participate in Ca^{2+} transfer through the placenta and in the maintenance of the maternal-fetal Ca^{2+} gradient [69]. Strid and *al.* determined that ATP-dependent Ca^{2+} transport by human syncytiotrophoblast BM vesicles was stimulated significantly by PTHrP (38–94) through the IP3–DAG–PKC second messenger pathway. PTHrP (38–94) increased Ca^{2+} transport at physiological concentrations [47]. So, with our results we can think that PTHrP regulates the level of PMCA expression in the same way that TCTP, that is to say PTHrP modulate PMCA activity by only one pathway. The signalisation by PTH1R involving, PTHrP (1-34) looks like PTH (1-34), is maybe a second pathway with low range, contrary to PTHrP (38-94), which seems to be the main mediator of PMCA activity.

According to van Abel and *al.*, cell Ca^{2+} efflux is not mainly transported by NCX under basal conditions. Involvement of NCX in Ca^{2+} extrusion in epithelial cells may be more related to conditions where intracellular Ca^{2+} levels show large variation. PMCA is possibly, under basal conditions, the main pathway of Ca^{2+} extrusion in

differentiated human trophoblasts, which is in agreement with the active placental transfer of Ca^{2+} against a concentration gradient [56].

Interestingly, the expression levels of NCX mRNA present a different regulation from other proteins studied. Indeed, on Day 2 we observed a trend to decrease and notably for cells treated with high concentrations of antagonist. However, after 4 days of treatment, cells show significant reduction of expression of all three genes. Moreover, recent findings show that PTH stimulates the expression level of NCX1 [58].

So we are led to believe that either antagonist PTH (7-34) decrease gradually NCX activity what would indicate that PTH and/or PTHrP, by their fragment (1-34) via PTH1R, act directly on the regulation of NCX by up-regulating their expression level; or the establishment of a compensatory way, in response to treatment with PTH1R antagonist, mediated by PTH via its receptor PTH2R would involve up-regulation of protein like PMCA to extract intracellular Ca^{2+} thus making NCX exchangers, proteins unnecessary in the Ca^{2+} transfer.

In parallel, in our work, cells JEG-3 treated with PTH (7-34) at different concentrations don't show difference, at Day 2, in Ca^{2+} uptake activity compared with untreated cells. However, treatments have an effect on the capacity of cells: treated cells with antagonist present an initial velocity lower, this can be explained by the decrease of expression levels of protein mRNA like NCX exchangers 1 and 3 or PMCA pumps, therefore the proteins responsible for the release of Ca^{2+}

After 4 days of treatment with antagonist, the plateau, in both treatment conditions, is higher than for untreated cells. This could be explained by the increase of expression level of TRPV6 mRNA, promoting the entry Ca^{2+} , and possibly the establishment of

a second pathway, after 4 days of treatment, involving either PTH via PTH2R or the PTHrP through another receptor, like PTH3R, only found at the *zebrafish* [70].

In summary, having treated JEG-3 cell line with the PTH1R antagonist PTH (7-34) allows us to learn more about the regulation of Ca^{2+} transport by PTH and PTHrP through the PTH1R receptor. Actually, Ca^{2+} transport regulation would seem influenced directly or indirectly by PTH/PTHrP via PTH1R regarding to expression level of NCX and TRPV6 mRNA mainly. TCTP and PMCA mRNA would not seem predominantly regulated by PTH1R pathway. However, Ca^{2+} transport appears regulated by PTH and/or PTHrP since after 4 days of treatment with PTH1R antagonist we can observe a significant increase of Ca^{2+} uptake activity at JEG-3 cells. This antagonist would reveals either PTH and/or PTHrP through PTH1R would inhibit Ca^{2+} transfer by down-regulating expression level of certain Ca^{2+} proteins, or PTH1R pathway inhibition would allow the establishment of second pathway making for ensure Ca^{2+} transport and fulfil needs of cells.

REFERENCES

1. Kovacs, C.S., et al., *Fetal parathyroids are not required to maintain placental calcium transport*. J Clin Invest, 2001. **107**(8): p. 1007-15.
2. Salle, B.L., et al., *Vitamin D metabolism in preterm infants*. Biol Neonate, 1987. **52 Suppl 1**: p. 119-30.
3. Kovacs, C.S., *PTHrP gene knock out mouse have placental calcium transport severely impaired*. J. Bone Miner, 1995. **10**(73).
4. Kovacs, C.S. and H.M. Kronenberg, *Maternal-fetal calcium and bone metabolism during pregnancy, puerperium, and lactation*. Endocr Rev, 1997. **18**(6): p. 832-72.
5. Greer, F.R., *Calcium, phosphorus, magnesium and the placenta*. Acta Paediatr Suppl, 1994. **405**: p. 20-4.
6. Belkacemi, L., L. Simoneau, and J. Lafond, *Calcium-binding proteins: distribution and implication in mammalian placenta*. Endocrine, 2002. **19**(1): p. 57-64.
7. Schuh, K., et al., *Interaction of the plasma membrane Ca²⁺ pump 4b/CI with the Ca²⁺/calmodulin-dependent membrane-associated kinase CASK*. J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 9778-83.
8. Kronenberg, H.M., F. R. Bringhurst, S. Nussbaum, H. Jüppner, A. B. Abou-Samra, G. V. Segre, and J. T. Potts Jr., *Parathyroid hormone: biosynthesis, secretion, chemistry, and action*, in *Handbook of Experimental Pharmacology*, K.J. G. R. Mundy and T. J. Martin, Editor. 1993, Physiology and Pharmacology of Bone: Heidelberg. p. 185–201.
9. Potts, J.T., Jr., and H. Jüppner, *Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in calcium homeostasis, bone metabolism, and bone development: the proteins, their genes, and receptors*, in *Metabolic Bone Disease*, L.V.A.a.S.M. Krane, Editor. 1997: New York. p. 51–94.
10. Jouishomme, H., et al., *Further definition of the protein kinase C activation domain of the parathyroid hormone*. J Bone Miner Res, 1994. **9**(6): p. 943-9.
11. Rixon, R.H., et al., *Parathyroid hormone fragments may stimulate bone growth in ovariectomized rats by activating adenylyl cyclase*. J Bone Miner Res, 1994. **9**(8): p. 1179-89.
12. Jouishomme, H., et al., *The protein kinase-C activation domain of the parathyroid hormone*. Endocrinology, 1992. **130**(1): p. 53-60.
13. Fujimori, A., et al., *Structure-function relationship of parathyroid hormone: activation of phospholipase-C, protein kinase-A and -C in osteosarcoma cells*. Endocrinology, 1992. **130**(1): p. 29-36.
14. Tashjian, A.H., Jr. and R.F. Gagel, *Teriparatide [human PTH(1-34)]: 2.5 years of experience on the use and safety of the drug for the treatment of osteoporosis*. J Bone Miner Res, 2006. **21**(3): p. 354-65.

15. Garel, J.M., *Distribution of labeled parathyroid hormone in rat fetus*. Horm Metab Res, 1972. **4**(2): p. 131-2.
16. David, L. and C.S. Anast, *Calcium metabolism in newborn infants. The interrelationship of parathyroid function and calcium, magnesium, and phosphorus metabolism in normal, "sick," and hypocalcemic newborns*. J Clin Invest, 1974. **54**(2): p. 287-96.
17. Rubin, L.P., et al., *Circulating levels of biologically active and immunoreactive intact parathyroid hormone in human newborns*. Pediatr Res, 1991. **29**(2): p. 201-7.
18. Kronenberg, H.M., *PTHrP and skeletal development*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1068**: p. 1-13.
19. Senior, P.V., D.A. Heath, and F. Beck, *Expression of parathyroid hormone-related protein mRNA in the rat before birth: demonstration by hybridization histochemistry*. J Mol Endocrinol, 1991. **6**(3): p. 281-90.
20. Care, A.D., et al., *The effect of fetal thyroparathyroidectomy on the transport of calcium across the ovine placenta to the fetus*. Placenta, 1986. **7**(5): p. 417-24.
21. Kovacs, C.S., et al., *Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) regulates fetal-placental calcium transport through a receptor distinct from the PTH/PTHrP receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(26): p. 15233-8.
22. Care, A.D., et al., *Stimulation of ovine placental transport of calcium and magnesium by mid-molecule fragments of human parathyroid hormone-related protein*. Exp Physiol, 1990. **75**(4): p. 605-8.
23. Rodda C.P., C.I.W., Martin T.J., *Role of the PTHrP in fetal and neonatal physiology in Parathyroid Hormone-Related Protein: Physiology and its role in cancer.*, H.B.P. Nissenson R.A., Editor. 1992, CRC Press: Boca Raton, FL. p. 169.
24. Everhart-Caye, M., et al., *Parathyroid hormone (PTH)-related protein(1-36) is equipotent to PTH(1-34) in humans*. J Clin Endocrinol Metab, 1996. **81**(1): p. 199-208.
25. Fraher, L.J., et al., *A comparison of the in vivo biochemical responses to exogenous parathyroid hormone-(1-34) [PTH-(1-34)] and PTH-related peptide-(1-34) in man*. J Clin Endocrinol Metab, 1992. **75**(2): p. 417-23.
26. Horiuchi, N., et al., *Similarity of synthetic peptide from human tumor to parathyroid hormone in vivo and in vitro*. Science, 1987. **238**(4833): p. 1566-8.
27. Kemp, B.E., et al., *Parathyroid hormone-related protein of malignancy: active synthetic fragments*. Science, 1987. **238**(4833): p. 1568-70.
28. Inomata, N., et al., *Characterization of a novel parathyroid hormone (PTH) receptor with specificity for the carboxyl-terminal region of PTH-(1-84)*. Endocrinology, 1995. **136**(11): p. 4732-40.
29. Pines, M., et al., *Generation and characterization of human kidney cell lines stably expressing recombinant human PTH/PTHrP receptor: lack of*

- interaction with a C-terminal human PTH peptide. *Endocrinology*, 1994. **135**(4): p. 1713-6.
30. Takasu, H., et al., *The 69-84 amino acid region of the parathyroid hormone molecule is essential for the interaction of the hormone with the binding sites with carboxyl-terminal specificity*. *Endocrinology*, 1996. **137**(12): p. 5537-43.
 31. Segre, G.V., *Receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein*, in *Principles in Bone Biology*, L.G.R. J. P. Bilezikian, and G. A. Rodan, Editor. 1996: New York. p. 377-403.
 32. Moreau, R., et al., *Expression of calcium channels along the differentiation of cultured trophoblast cells from human term placenta*. *Biol Reprod*, 2002. **67**(5): p. 1473-9.
 33. Peng, J.B., E.M. Brown, and M.A. Hediger, *Structural conservation of the genes encoding CaT1, CaT2, and related cation channels*. *Genomics*, 2001. **76**(1-3): p. 99-109.
 34. Okano, T., et al., *Regulation of gene expression of epithelial calcium channels in intestine and kidney of mice by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2004. **89-90**(1-5): p. 335-8.
 35. Sanchez, J.C., et al., *Translationally controlled tumor protein: a protein identified in several nontumoral cells including erythrocytes*. *Electrophoresis*, 1997. **18**(1): p. 150-5.
 36. Xu, A., A.R. Bellamy, and J.A. Taylor, *Expression of translationally controlled tumour protein is regulated by calcium at both the transcriptional and post-transcriptional level*. *Biochem J*, 1999. **342 Pt 3**: p. 683-9.
 37. Rao, K.V., et al., *Cloning and characterization of a calcium-binding, histamine-releasing protein from Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(34): p. 31207-13.
 38. Gnanasekar, M., et al., *Molecular characterization of a calcium binding translationally controlled tumor protein homologue from the filarial parasites Brugia malayi and Wuchereria bancrofti*. *Mol Biochem Parasitol*, 2002. **121**(1): p. 107-18.
 39. Arcuri, F., et al., *Translationally controlled tumor protein (TCTP) in the human prostate and prostate cancer cells: expression, distribution, and calcium binding activity*. *Prostate*, 2004. **60**(2): p. 130-40.
 40. Kim, M., et al., *Identification of the calcium binding sites in translationally controlled tumor protein*. *Arch Pharm Res*, 2000. **23**(6): p. 633-6.
 41. Zoccola, D., et al., *Molecular cloning and localization of a PMCA P-type calcium ATPase from the coral Stylophora pistillata*. *Biochim Biophys Acta*, 2004. **1663**(1-2): p. 117-26.
 42. Zylinska, L., et al., *The isoform- and location-dependence of the functioning of the plasma membrane calcium pump*. *Cell Mol Biol Lett*, 2002. **7**(4): p. 1037-45.

43. Stauffer, T.P., et al., *Quantitative analysis of alternative splicing options of human plasma membrane calcium pump genes*. J Biol Chem, 1993. **268**(34): p. 25993-6003.
44. Lafond, J., M. Leclerc, and M.G. Brunette, *Characterization of calcium transport by basal plasma membranes from human placental syncytiotrophoblast*. J Cell Physiol, 1991. **148**(1): p. 17-23.
45. Howard, A., S. Legon, and J.R. Walters, *Plasma membrane calcium pump expression in human placenta and small intestine*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. **183**(2): p. 499-505.
46. Strid, H. and T.L. Powell, *ATP-dependent Ca²⁺ transport is up-regulated during third trimester in human syncytiotrophoblast basal membranes*. Pediatr Res, 2000. **48**(1): p. 58-63.
47. Strid, H., et al., *Parathyroid hormone-related peptide (38-94) amide stimulates ATP-dependent calcium transport in the Basal plasma membrane of the human syncytiotrophoblast*. J Endocrinol, 2002. **175**(2): p. 517-24.
48. Linck, B., et al., *Functional comparison of the three isoforms of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX1, NCX2, NCX3)*. Am J Physiol, 1998. **274**(2 Pt 1): p. C415-23.
49. Blaustein, M.P. and W.J. Lederer, *Sodium/calcium exchange: its physiological implications*. Physiol Rev, 1999. **79**(3): p. 763-854.
50. Philipson, K.D. and D.A. Nicoll, *Molecular and kinetic aspects of sodium-calcium exchange*. Int Rev Cytol, 1993. **137C**: p. 199-227.
51. Nicoll, D.A., S. Longoni, and K.D. Philipson, *Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger*. Science, 1990. **250**(4980): p. 562-5.
52. Shieh, B.H., et al., *Mapping of the gene for the cardiac sarcolemmal Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger to human chromosome 2p21-p23*. Genomics, 1992. **12**(3): p. 616-7.
53. Li, Z., et al., *Cloning of the NCX2 isoform of the plasma membrane Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger*. J Biol Chem, 1994. **269**(26): p. 17434-9.
54. Nicoll, D.A., et al., *Cloning of a third mammalian Na⁺-Ca²⁺ exchanger, NCX3*. J Biol Chem, 1996. **271**(40): p. 24914-21.
55. Kamath, S.G. and C.H. Smith, *Na⁺/Ca²⁺ exchange, Ca²⁺ binding, and electrogenic Ca²⁺ transport in plasma membranes of human placental syncytiotrophoblast*. Pediatr Res, 1994. **36**(4): p. 461-7.
56. Moreau, R., et al., *Expression and role of calcium-ATPase pump and sodium-calcium exchanger in differentiated trophoblasts from human term placenta*. Mol Reprod Dev, 2003. **65**(3): p. 283-8.
57. Williams, J.M., et al., *Inhibitor action on placental calcium transport*. Calcif Tissue Int, 1991. **48**(1): p. 7-12.
58. van Abel, M., et al., *Age-dependent alterations in Ca²⁺ homeostasis: role of TRPV5 and TRPV6*. Am J Physiol Renal Physiol, 2006. **291**(6): p. F1177-83.

59. Moreau, R., L. Simoneau, and J. Lafond, *Characteristics of calcium uptake by BeWo cells, a human trophoblast cell line*. *Placenta*, 2001. **22**(8-9): p. 768-75.
60. Moreau, R., et al., *Calcium uptake and calcium transporter expression by trophoblast cells from human term placenta*. *Biochim Biophys Acta*, 2002. **1564**(2): p. 325-32.
61. Arcuri, F., et al., *The translationally controlled tumor protein is a novel calcium binding protein of the human placenta and regulates calcium handling in trophoblast cells*. *Biol Reprod*, 2005. **73**(4): p. 745-51.
62. Smith, N.C., M.G. Brush, and S. Lockett, *Preparation of human placental villous surface membrane*. *Nature*, 1974. **252**(5481): p. 302-3.
63. Lafond, J., et al., *Parathyroid hormone receptor in human placental syncytiotrophoblast brush border and basal plasma membranes*. *Endocrinology*, 1988. **123**(6): p. 2834-40.
64. el Mabrouk, M., et al., *Asymmetrical distribution of G proteins in syncytiotrophoblastic brush-border and basal-plasma membranes of human term placenta*. *Placenta*, 1996. **17**(7): p. 471-7.
65. Farrugia, W., et al., *Parathyroid hormone(1-34) and parathyroid hormone-related protein(1-34) stimulate calcium release from human syncytiotrophoblast basal membranes via a common receptor*. *J Endocrinol*, 2000. **166**(3): p. 689-95.
66. Potts, J.T., Jr;Bringham, F R.;Gardella, T.;Nussbaum, S.;Segre, G.; Kronenberg, H., *Endocrinology*, D.L. J., Editor. 1995, Saunders: Philadelphia. p. 920-966.
67. Usdin, T.B., C. Gruber, and T.I. Bonner, *Identification and functional expression of a receptor selectively recognizing parathyroid hormone, the PTH2 receptor*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(26): p. 15455-8.
68. Hershberger, M.E. and R.S. Tuan, *Placental 57-kDa Ca(2+)-binding protein: regulation of expression and function in trophoblast calcium transport*. *Dev Biol*, 1998. **199**(1): p. 80-92.
69. Lafond, J. and L. Simoneau, *Calcium homeostasis in human placenta: role of calcium-handling proteins*. *Int Rev Cytol*, 2006. **250**: p. 109-74.
70. Rubin, D.A. and H. Juppner, *Zebrafish express the common parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor (PTH1R) and a novel receptor (PTH3R) that is preferentially activated by mammalian and fugu fish parathyroid hormone-related peptide*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(40): p. 28185-90.

Table 2-1 : Oligonucleotide primers used in real time PCR

Gene	Primers		Product size (bp)
	Sense (5'-3')	Anti-sense (3'-5')	
TRPV6	TCT GCG GAC GGG AGT ATG G	CCT GTG CGT AGC GTT GGA T	96
TCTP	TGT TCT CCG ACA TCT ACA AGA TCC	TTC TGT CCT ACT GAC CAT CTT CC	83
NCX1	GTG CTG GGG AAG ATG ATG ACG A	ACA CGC CCA GCC ATT CCA GTA	146
NCX2	ACG GTG GAT AAA CTC ATC AAG AA	GCT CAC CGT AAT TGC CTC TAA	93
NCX3	AGA GAT GGG AAA GCC AGT ATT	ACC GTA GTC TTG AAC TCA TAG G	81
PMCA1	CAG CAG GAG AAC CAG AAC CA	ATT CCA GCC CTC TGA CAC TT	139
PMCA4	TCA GGA ATC CCA ACG GTG	TCG ATG ACA GTG CGT ACC	148
G6PDH	TAC GGC AAC AGA TAC AAG AAC G	TCG GCT GCC ATA AAT ATA GG	192

Table 2-2 : Initial velocity and plateau of Ca^{2+} uptake by trophoblasts according to day of culture

Day of cells culture	Condition	V_i (nmol/mg/min)	V_i ratio ^a (V_{ix}/V_{iCTL})	Plateau (nmol/mg)	P ratio ^b (P_x/P_{CTL})
2	CTL	15.13 ± 3.77	1	8.92 ± 0.88	1
	PTH (7-34) 10^{-9} M	13.16 ± 2.54	0.87	10.72 ± 0.94	1.20
	PTH (7-34) 10^{-7} M	5.66 ± 1.14	0.38 ^c	7.56 ± 0.92	0.85
4	CTL	3.94 ± 0.83	1	7.67 ± 0.63	1
	PTH (7-34) 10^{-9} M	3.48 ± 0.51	0.88	11.57 ± 1.24	1.51 ^d
	PTH (7-34) 10^{-7} M	2.98 ± 0.43	0.76	10.38 ± 0.77	1.35 ^d

^a The V_i ratio was estimated as the V_i of the corresponding day and condition (V_{ix}) divided by the V_i of CTL of the same day (V_{iCTL}).

^b The P ratio was calculated as the Ca^{2+} uptake corresponding at plateau of the condition (P_x) divided by the value of control condition of the same day (P_{CTL}).

^c $p < 0.01$ compared to CTL of Day 2.

^d $p < 0.05$ compared to CTL of Day 4

Figure 2-1 : Kinetics of Ca²⁺ uptake by JEG-3 cells after treatment with PTH (7-34).

Cells were treated with different concentration of PTH (7-34), 10⁻⁹ M, 10⁻⁷ M or without as control. After 2 days (A) or 4 days (B) of culture cells were incubated at 37°C in HBSS containing 1.26 mM CaCl₂ and 5 μCi/well of ⁴⁵CaCl₂ for 0.25-30 minutes. The transport was stopped by removing the incubation medium, and cells were washed with PBS containing 4 mM EGTA. Initial velocities have been computed for shorter times (Inserts : 15, 30, 45, and 60 sec) for both 2 and 4 days of treatment with 10⁻⁹ M and 10⁻⁷ M of PTH (7-34) and control conditions.. The results represent the mean ± SEM of 4 cell preparations in duplicate.

Figure 2-2 : Relative expression of the TRPV6 mRNA in JEG-3 according to PTH (7-34) concentration.

The level of the TRPV6 mRNA expression was evaluated by qRT-PCR analysis. JEG-3 cells were incubated for 2 (A) and 4 (B) days with PTH (7-34) at different concentrations (10⁻¹³ M, 10⁻¹¹ M, 10⁻⁹ M, 10⁻⁷ M and without treatment). Expression of TRPV6 mRNA was determined in duplicate in three separate experiments. Results are expressed as the mean ± SEM (n=3 for each condition). * p < 0.05, ** p < 0.01.

Figure 2-3 : Relative expression of the TCTP mRNA in JEG-3 according to PTH (7-34) concentration.

The level of the TCTP mRNA expression was evaluated by qRT-PCR analysis. JEG-3 cells were incubated for 2 (A) and 4 (B) days with PTH (7-34) at different concentrations (10⁻¹³ M, 10⁻¹¹ M, 10⁻⁹ M, 10⁻⁷ M and without treatment). Expression of TCTP mRNA was determined in duplicate in three separate experiments. Results are expressed as the mean ± SEM (n=3 for each condition). * p < 0.05, ** p < 0.01.

Figure 2-4 : Relative expression of the PMCA1 mRNA in JEG-3 according to PTH (7-34) concentration.

The level of the PMCA1 mRNA expression was evaluated by qRT-PCR analysis. JEG-3 cells were incubated for 2 (A) and 4 (B) days with PTH (7-34) at different concentrations (10⁻¹³ M, 10⁻¹¹ M, 10⁻⁹ M, 10⁻⁷ M and without treatment). Expression of TCTP mRNA was determined in duplicate in three separate experiments. Results are expressed as the mean ± SEM (n=3 for each condition). * p < 0.05.

Figure 2-5 : Relative expression of the PMCA4 mRNA in JEG-3 according to PTH (7-34) concentration.

The level of the PMCA4 mRNA expression was evaluated by qRT-PCR analysis. JEG-3 cells were incubated for 2 (A) and 4 (B) days with PTH (7-34) at different concentrations (10⁻¹³ M, 10⁻¹¹ M, 10⁻⁹ M, 10⁻⁷ M and without treatment).

Expression of TCTP mRNA was determined in duplicate in three separate experiments. Results are expressed as the mean \pm SEM (n=3 for each condition).

Figure 2-6 : Relative expression of the NCX1 mRNA in JEG-3 according to PTH (7-34) concentration.

The level of the NCX1 mRNA expression was evaluated by qRT-PCR analysis. JEG-3 cells were incubated for 2 (A) and 4 (B) days with PTH (7-34) at different concentrations (10^{-13} M, 10^{-11} M, 10^{-9} M, 10^{-7} M and without treatment). Expression of TCTP mRNA was determined in duplicate in three separate experiments. Results are expressed as the mean \pm SEM (n=3 for each condition). * p < 0.05, *** p < 0.001.

Figure 2-7 : Relative expression of the NCX2 mRNA in JEG-3 according to PTH (7-34) concentration.

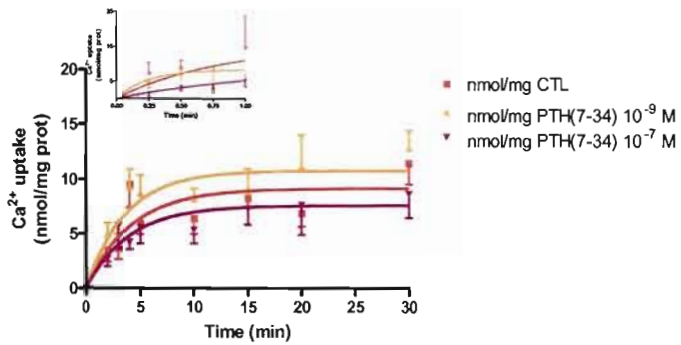
The level of the NCX2 mRNA expression was evaluated by qRT-PCR analysis. JEG-3 cells were incubated for 2 (A) and 4 (B) days with PTH (7-34) at different concentrations (10^{-13} M, 10^{-11} M, 10^{-9} M, 10^{-7} M and without treatment). Expression of TCTP mRNA was determined in duplicate in three separate experiments. Results are expressed as the mean \pm SEM (n=3 for each condition). ** p < 0.01, *** p < 0.001.

Figure 2-8 : Relative expression of the NCX3 mRNA in JEG-3 according to PTH (7-34) concentration.

The level of the NCX3 mRNA expression was evaluated by qRT-PCR analysis. JEG-3 cells were incubated for 2 (A) and 4 (B) days with PTH (7-34) at different concentrations (10^{-13} M, 10^{-11} M, 10^{-9} M, 10^{-7} M and without treatment). Expression of TCTP mRNA was determined in duplicate in three separate experiments. Results are expressed as the mean \pm SEM (n=3 for each condition). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

Figure 2-1 :

A- Ca^{2+} uptake studies after 2 days of treatment with PTH (7-34)



B- Ca^{2+} uptake studies after 4 days of treatment with PTH (7-34)

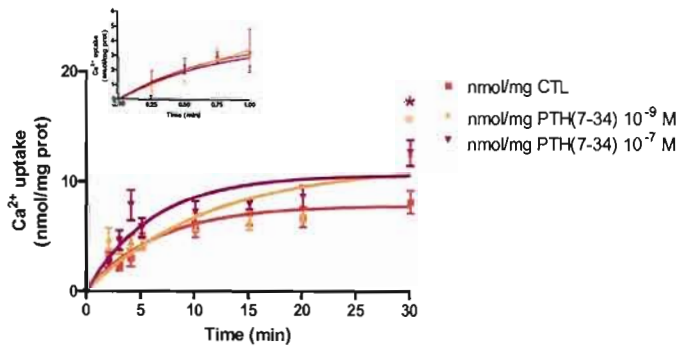
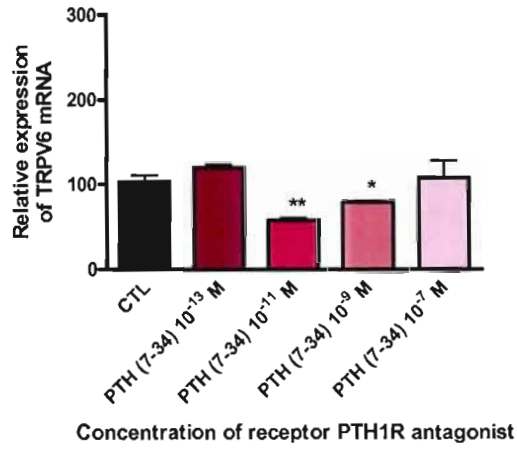


Figure 2-2 :

A- Expression level of TRPV6 mRNA on day 2



B- Expression level of TRPV6 mRNA on day 4

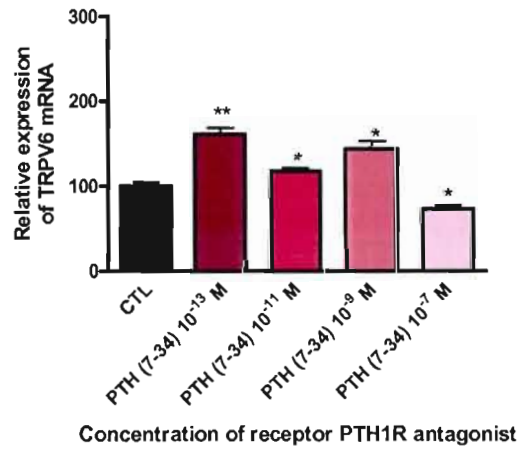
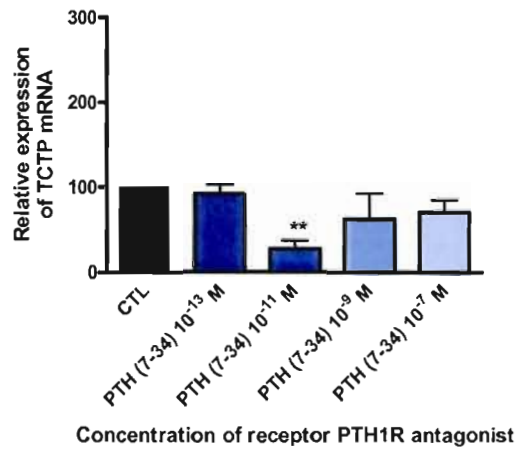


Figure 2-3 :

A- Expression level of TCTP mRNA on day 2



B- Expression level of TCTP mRNA on day 4

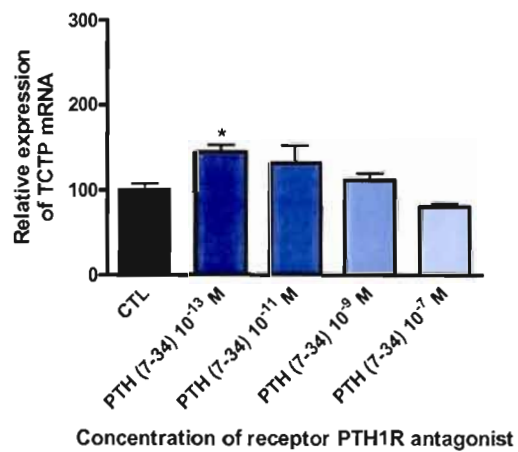
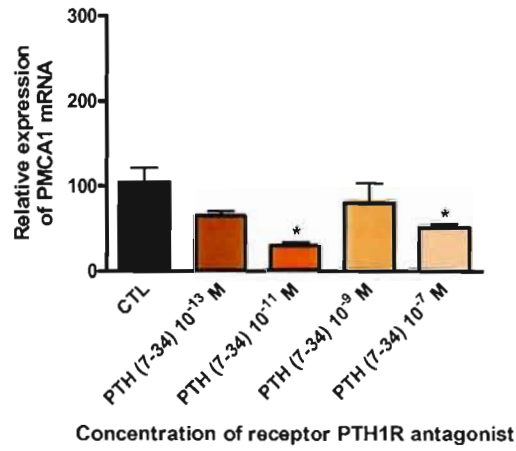


Figure 2-4 :

A- Expression level of PMCA1 mRNA on day 2



B- Expression level of PMCA1 mRNA on day 4

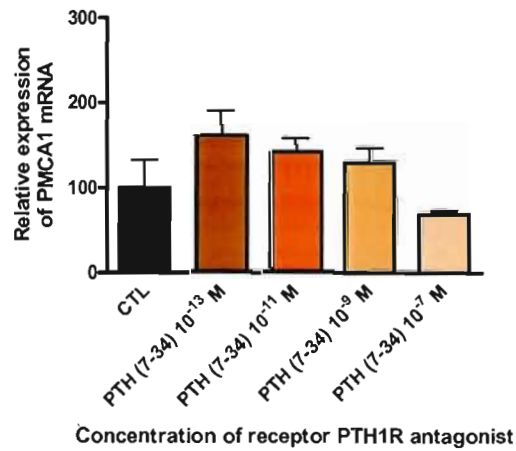
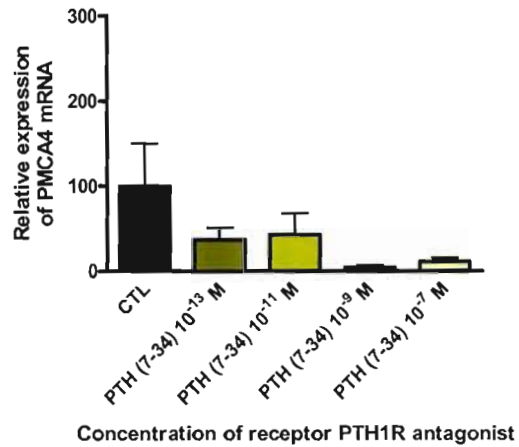


Figure 2-5 :

A- Expression level of PMCA4 mRNA on day 2



B- Expression level of PMCA4 mRNA on day 4

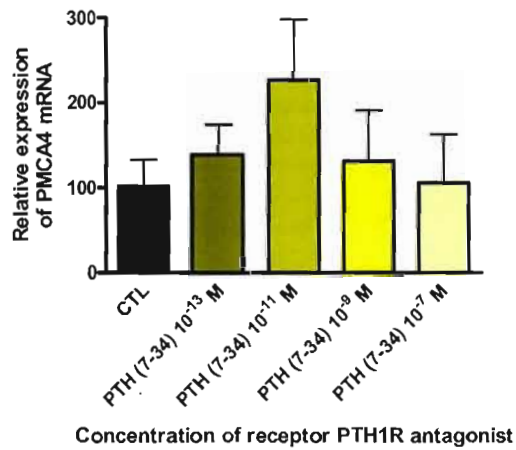
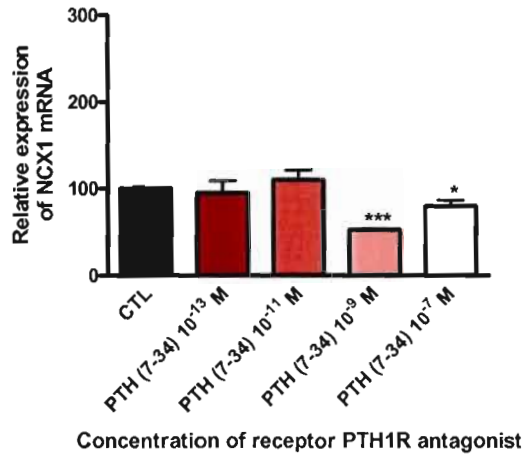


Figure 2-6 :

A- Expression level of NCX1 mRNA on day 2



B- Expression level of NCX1 mRNA on day 4

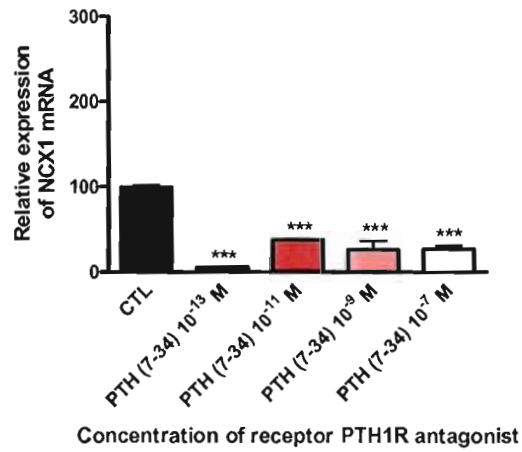
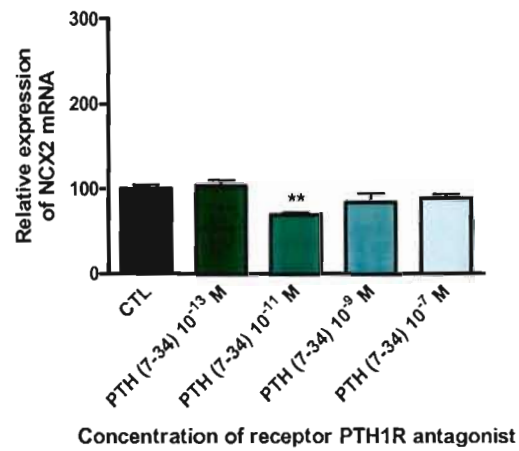


Figure 2-7 :

A- Expression level of NCX2 mRNA on day 2



B- Expression level of NCX2 mRNA on day 4

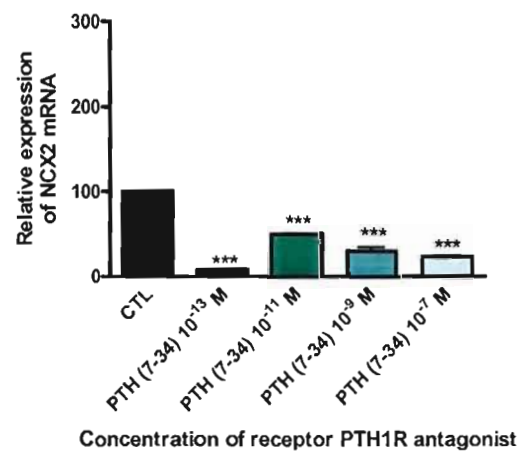
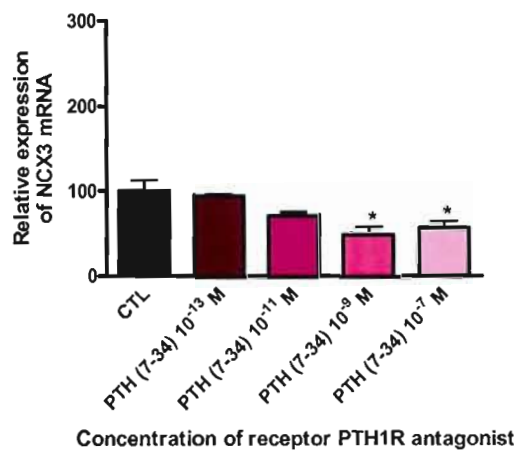
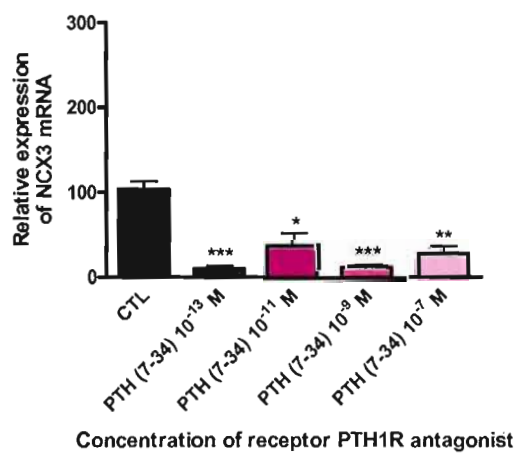


Figure 2-8 :

A- Expression level of NCX3 mRNA on day 2



B- Expression level of NCX3 mRNA on day 4



3 CHAPITRE III

CONCLUSION ET DISCUSSION

Une concentration calcique adéquate dans l'environnement fœtal durant la grossesse représente un facteur important et indispensable pour une croissance adéquate du fœtus. En effet, le Ca^{2+} est un ion indispensable au bon développement fœtal ainsi qu'à sa croissance : il est essentiel à la minéralisation du squelette et la formation des os, en plus d'être grandement impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires. Le transport du Ca^{2+} à travers les syncytiotrophoblastes s'effectue par divers mécanismes, dont la diffusion simple, le transport facilité et le transport actif. Il existe plusieurs transporteurs de Ca^{2+} , dont les protéines de cette présente étude font partie, qui sont exprimés au niveau du syncytiotrophoblaste et qui sont responsables de ce transfert calcique.

Le transport de Ca^{2+} est sous la gouverne d'une hormone produite par plusieurs types de cellules fœtales tout au long du développement. Cette hormone, la PTHrP est présente dans le liquide amniotique et a pour fonction de contrôler les transporteurs de calcium situés dans le placenta. En contrôlant les transporteurs, la PTHrP module, du fait même, le taux de calcium qui pourra pénétrer dans le placenta pour enfin rejoindre la circulation fœtale [259]. Dans les circonstances physiologiques, la PTH, également une hormone hypercalcémiante, est produite localement dans de nombreux tissus où elle est un effecteur autocrine/paracrine, en particulier dans le développement embryonnaire, la régulation de la croissance et la différenciation de nombreux types cellulaires.

Afin de fournir une croissance et un développement adéquat au fœtus, il est primordial de déterminer et définir les régulations physiologiques et biochimiques des échanges trans-placentaires en cours de grossesse, qui sont encore très peu connues à ce jour.

Notre équipe de recherche travaille depuis plusieurs années à éclaircir le mode d'action de la PTHrP et de la PTH durant la grossesse sur le transport de calcium. En effet, les modifications physiologiques qui ont lieu durant la grossesse influencent grandement le transport de calcium chez la femme et, par conséquent, font varier la quantité de calcium disponible pour le transfert vers le fœtus. De ce fait, notre laboratoire a développé des outils afin d'éclaircir plusieurs aspects de cette relation mère/placenta/fœtus. Ainsi, nous cherchons à comprendre comment se déroule le transfert calcique par les cellules trophoblastiques du placenta humain. Pour ce faire, à l'aide de techniques biochimiques et de biologie moléculaire, nous étudions le rôle et les impacts du récepteur hormonal de la PTH/PTHrP : le PTH1R sur la régulation d'expression de canaux calciques (comme TRPV6), des pompes ATP-dépendantes (dont PMCA1 et PMCA4), des échangeurs sodium-calcium (NCX) et des molécules intracellulaires (comme TCTP) qui peuvent être modulé en fonction des hormones PTH et/ou PTHrP, deux hormones connues pour être hypercalcémiantes. La compréhension de ces échanges placentaires est capitale dans le développement des moyens thérapeutiques visant à prévenir certains pathologiques du fœtus et du nouveau-né.

Les travaux effectués consistaient au traitement des cellules JEG-3 avec un antagoniste du PTH1R, la PTH (7-34), afin d'analyser les niveaux d'expression de certaines protéines intervenant dans les mouvements trans-placentaires calciques, ainsi que d'évaluer la capacité des cellules à transporter le calcium. Au bout de 2 jours de traitement seulement des tendances de niveau d'expression sont observables sans significativité évidente. Les cellules montrent donc une tendance non

significative à la diminution d'expression des protéines calciques étudiées au niveau ARNm, sauf TRPV6, alors que les études de transport calcique montrent une diminution de la capacité des cellules à faire entrer le calcium

Par ailleurs, au niveau de l'expression des ARNm dans les JEG-3 après 4 jours de traitement, nos résultats ont démontré une forte diminution de l'expression des ARNm des différentes isoformes de la protéine NCX en absence de signalisation via PTH1R ; contrairement à TRPV6 qui voit son niveau d'expression significativement augmentée. Par ailleurs, au quatrième jour d'inhibition du PTH1R, les JEG-3 montrent une augmentation de capacité à transporter le Ca^{2+} . Cependant les ARNm de TCTP, PMCA1, et PMCA4 ne semblent pas régulés par la signalisation découlant de la fixation de la PTH et/ou la PTHrP sur le récepteur PTH1R. Au vu de ces résultats, il semblerait que seules les trois isoformes de l'échangeur Na^+/Ca^{2+} soient régulées, directement ou non, par la fixation de la PTH et/ou PTHrP sur le PTH1R au sein de la lignée cellulaire JEG-3. Cependant, une seconde voie de signalisation cellulaire semblerait mise en place puisque les cellules se montrent plus aptes à transporter le Ca^{2+} après 4 jours de traitement.

Le récepteur PTH1R serait donc le récepteur par lequel la PTHrP, plus particulièrement le peptide (1-34) de celle-ci, agit dans le but de maintenir un gradient de concentration calcique allant de la mère vers le fœtus. En revanche, la régulation des protéines calciques serait d'avantage sous le contrôle de la PTHrP, mais plus particulièrement de la partie intermédiaire de cette hormone, c'est à dire le peptide (38-94/95/101). Ce dernier agirait via un récepteur plus spécifique à la PTHrP et de la même famille que le PTH1R. Ce récepteur, le PTH3R, est actuellement retrouvé chez le poisson zèbre, par contre sa présence chez l'humain reste à prouver. PTH1R serait également le médiateur de l'action de la PTH, et plus particulièrement du peptide (1-34) de la PTH. L'action de la PTH via ce récepteur viserait à maintenir l'homéostasie calcique, tant plasmatique qu'interstitielle, durant la grossesse.

L'étude de l'expression placentaire des protéines calciques est capitale afin de comprendre la régulation du transport de calcium. Il serait intéressant d'étudier d'avantage la régulation hormonale sur ce transport, notamment en étudiant l'action d'antagonistes sur le récepteur PTH2R et sur le PTH1R, mais aussi de regarder l'influence des ces hormones sur les niveaux protéiques en plus des niveaux d'ARNm.

Nous espérons que ces résultats pourront contribuer à de nouvelles découvertes dans le monde de la biologie qui ne cesse d'être méconnu et intarissable pour de futures découvertes.

4 CHAPITRE IV

BIBLIOGRAPHIE

1. Sideri, V., Trainoldi and Remotti, *The ultrastructural basis of the nutritional transfer: Evidence of different patterns in the plasma membranes of the multilayered placental barrier*. 1983.
2. Brunette, M.G., D. Auger, and J. Lafond, *Effect of parathyroid hormone on PO4 transport through the human placenta microvilli*. *Pediatr Res*, 1989. **25**(1): p. 15-8.
3. Desoye, G. and E. Shafir, *Placental metabolism and its regulation in health and diabetes*. *Mol Aspects Med*, 1994. **15**(6): p. 505-682.
4. Rasmussen, H., *The calcium messenger system (2)*. *N Engl J Med*, 1986. **314**(18): p. 1164-70.
5. Rasmussen, H., *The calcium messenger system (1)*. *N Engl J Med*, 1986. **314**(17): p. 1094-101.
6. Salle, B.L., et al., *Vitamin D metabolism in preterm infants*. *Biol Neonate*, 1987. **52 Suppl 1**: p. 119-30.
7. Leclerc, M., Brunette, M.G. et Lafond, J., *Caractérisation du transport du calcium (Ca²⁺) par la bordure en brosse de la cellule syncytiotrophoblastique*. *Méd. Sci.*, 1990. **68A**.
8. Lafond, J., M. Leclerc, and M.G. Brunette, *Characterization of calcium transport by basal plasma membranes from human placental syncytiotrophoblast*. *J Cell Physiol*, 1991. **148**(1): p. 17-23.
9. Barlet, J.P., M.J. Davicco, and V. Coxam, *Synthetic parathyroid hormone-related peptide (1-34) fragment stimulates placental calcium transfer in ewes*. *J Endocrinol*, 1990. **127**(1): p. 33-7.
10. Care, A.D., et al., *Stimulation of ovine placental transport of calcium and magnesium by mid-molecule fragments of human parathyroid hormone-related protein*. *Exp Physiol*, 1990. **75**(4): p. 605-8.
11. Kovacs, C.S., et al., *Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) regulates fetal-placental calcium transport through a receptor distinct from the PTH/PTHrP receptor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(26): p. 15233-8.
12. Farrugia, W., et al., *Parathyroid hormone(1-34) and parathyroid hormone-related protein(1-34) stimulate calcium release from human syncytiotrophoblast basal membranes via a common receptor*. *J Endocrinol*, 2000. **166**(3): p. 689-95.
13. Ardawi, M.S., H.A. Nasrat, and B.A.A. HS, *Calcium-regulating hormones and parathyroid hormone-related peptide in normal human pregnancy and postpartum: a longitudinal study*. *Eur J Endocrinol*, 1997. **137**(4): p. 402-9.

14. Ferguson, J.E., 2nd, et al., *Abundant expression of parathyroid hormone-related protein in human amnion and its association with labor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(17): p. 8384-8.
15. Ferguson, J.E., 2nd, et al., *Expression of parathyroid hormone-related protein and its receptor in human umbilical cord: evidence for a paracrine system involving umbilical vessels*. Am J Obstet Gynecol, 1994. **170**(4): p. 1018-24; discussion 1024-6.
16. Wysolmerski, J.J. and A.F. Stewart, *The physiology of parathyroid hormone-related protein: an emerging role as a developmental factor*. Annu Rev Physiol, 1998. **60**: p. 431-60.
17. Malassine, A., et al., *Acetylated low density lipoprotein endocytosis by human syncytiotrophoblast in culture*. Placenta, 1990. **11**(2): p. 191-204.
18. Kaaja, R., *Insulin resistance syndrome in preeclampsia*. Semin Reprod Endocrinol, 1998. **16**(1): p. 41-6.
19. Bernstein, E., et al., *Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference*. Nature, 2001. **409**(6818): p. 363-6.
20. Lewis, S.e.B., K, *Chapter 43 : Placenta*, in *Histology for pathologists*, R.P. Ltd, Editor. 1992: New York. p. 835-863.
21. Gray, H., Bannister, L.H. Berry, M.M. Williams, P.L., *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Medicine & Surgery*. 38th edition ed ed. 1995, New York: Churchill Livingstone.
22. Alsat, E., *Placentation et hypoxie : Hypoxie placentaire = Placentation and hypoxia*. Reproduction humaine et hormones, 2002. **15**: p. 219-224.
23. Faber, J.J.a.T., K.L., *Structural features of placental exchange*, in *Placental Physiology*, R. Press, Editor. 1983: New York. p. 1-32.
24. Lemons, J.A. and R.L. Schreiner, *Metabolic balance of the ovine fetus during the fed and fasted states*. Ann Nutr Metab, 1984. **28**(5): p. 268-80.
25. Jones, C.T., *Pathways of communication between the placenta and foetus, potentially important in the regulation of growth and state*, in *Foetal and neonatal development*, C.T. Jones, Editor. 1988, Perinatology Press: New York. p. 68-79.
26. Hay, W.W., *Placental metabolism of glucose in relation to foetal nutrition*, in *Foetal and neonatal development*, C.T. Jones, Editor. 1988, Perinatology Press: New York. p. 58-67.
27. Alsat, E., Malassiné, A., Tarrade, A., Merviel, P. and Évain-Brion, D., *Le cytotrophoblaste humain, un casse-tête pour le biologiste*, M. Sciences, Editor. 1999. p. 1236-1243.
28. Knipp, G.T., K.L. Audus, and M.J. Soares, *Nutrient transport across the placenta*. Adv Drug Deliv Rev, 1999. **38**(1): p. 41-58.
29. Lafond, J., et al., *Parathyroid hormone receptor in human placental syncytiotrophoblast brush border and basal plasma membranes*. Endocrinology, 1988. **123**(6): p. 2834-40.

30. Robidoux, J., et al., *Human syncytiotrophoblast NPY receptors are located on BBM and activate PLC-to-PKC axis*. Am J Physiol, 1998. **274**(3 Pt 1): p. E502-9.
31. Lafond, J., N. Ayotte, and M.G. Brunette, *Effect of (1-34) parathyroid hormone-related peptide on the composition and turnover of phospholipids in syncytiotrophoblast brush border and basal plasma membranes of human placenta*. Mol Cell Endocrinol, 1993. **92**(2): p. 207-14.
32. Lafond, J., et al., *Calcitonin receptor in human placental syncytiotrophoblast brush border and basal plasma membranes*. Mol Cell Endocrinol, 1994. **99**(2): p. 285-92.
33. Whitsett, J.A., et al., *Beta-Adrenergic receptors and catecholamine-sensitive adenylate cyclase of the human placenta*. J Clin Endocrinol Metab, 1980. **50**(1): p. 27-32.
34. Whitsett, J.A., *Specializations in plasma membranes of the human placenta*. J Pediatr, 1980. **96**(3 Pt 2): p. 600-3.
35. Battaglia, F.C.a.M., G, *An introduction to fetal physiology*. Academic Press. 1986, Orlando.
36. Morriss, F.H.J.a.B., R.D.H, *Placental transport*, in *Physiology of reproduction*. 1988: New York. p. 2043-83.
37. Hay, W.W., Jr., *Placental transport of nutrients to the fetus*. Horm Res, 1994. **42**(4-5): p. 215-22.
38. Schneider, H., *The role of the placenta in nutrition of the human fetus*. Am J Obstet Gynecol, 1991. **164**(4): p. 967-73.
39. Henriksen, T., *Foetal nutrition, foetal growth restriction and health later in life*. Acta Paediatr Suppl, 1999. **88**(429): p. 4-8.
40. Power, M.L., et al., *The role of calcium in health and disease*. Am J Obstet Gynecol, 1999. **181**(6): p. 1560-9.
41. MacIsaac, R.J., et al., *Role of the fetal parathyroid glands and parathyroid hormone-related protein in the regulation of placental transport of calcium, magnesium and inorganic phosphate*. Reprod Fertil Dev, 1991. **3**(4): p. 447-57.
42. Pitkin, R.M., *Calcium metabolism in pregnancy and the perinatal period: a review*. Am J Obstet Gynecol, 1985. **151**(1): p. 99-109.
43. Pitkin, R.M., *Endocrine regulation of calcium homeostasis during pregnancy*. Clin Perinatol, 1983. **10**(3): p. 575-92.
44. Faber, J.J. and K.L. Thornburg, *Fetal nutrition: supply, combustion, interconversion, and deposition*. Fed Proc, 1986. **45**(10): p. 2502-7.
45. Garnica, A.D. and W.Y. Chan, *The role of the placenta in fetal nutrition and growth*. J Am Coll Nutr, 1996. **15**(3): p. 206-22.
46. Stulc, J. and B. Stulcova, *Transport of calcium by the placenta of the rat*. J Physiol, 1986. **371**: p. 1-16.

47. Kamath, S.G., N. Haider, and C.H. Smith, *ATP independent calcium transport and binding by basal plasma membrane of human placenta*. Placenta, 1994. **15**(2): p. 147-55.
48. Fisher, G.J., L.K. Kelley, and C.H. Smith, *ATP-dependent calcium transport across basal plasma membranes of human placental trophoblast*. Am J Physiol, 1987. **252**(1 Pt 1): p. C38-46.
49. Sastry, B.V., *Techniques to study human placental transport*. Adv Drug Deliv Rev, 1999. **38**(1): p. 17-39.
50. David, L. and C.S. Anast, *Calcium metabolism in newborn infants. The interrelationship of parathyroid function and calcium, magnesium, and phosphorus metabolism in normal, "sick," and hypocalcemic newborns*. J Clin Invest, 1974. **54**(2): p. 287-96.
51. Garel, J.M., A.D. Care, and J.P. Barlet, *A radioimmunoassay for ovine calcitonin: an evaluation of calcitonin secretion during gestation, lactation and foetal life*. J Endocrinol, 1974. **62**(3): p. 497-509.
52. Kovacs, C.S., et al., *Fetal parathyroids are not required to maintain placental calcium transport*. J Clin Invest, 2001. **107**(8): p. 1007-15.
53. Mangin, M., et al., *Identification of a cDNA encoding a parathyroid hormone-like peptide from a human tumor associated with humoral hypercalcemia of malignancy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(2): p. 597-601.
54. Naylor, S.L., et al., *Human parathyroid hormone gene (PTH) is on short arm of chromosome 11*. Somatic Cell Genet, 1983. **9**(5): p. 609-16.
55. Comings, D.E., *Evidence for ancient tetraploidy and conservation of linkage groups in mammalian chromosomes*. Nature, 1972. **238**(5365): p. 455-7.
56. Philbrick, W.M., et al., *Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology*. Physiol Rev, 1996. **76**(1): p. 127-73.
57. Kronenberg, H.M., Bringham, R.F., Serge, G.V. and Potts, J.T.Jr., *Parathyroid hormone biosynthesis and metabolism*, in *The Parathyroids*, J.P. Bilezikian, Editor. 1994, M.A.Levine and R. Marcus Raven Press: New York. p. 125-137.
58. Brown, E.M., *Extracellular Ca²⁺ sensing, regulation of parathyroid cell function, and role of Ca²⁺ and other ions as extracellular (first) messengers*. Physiol Rev, 1991. **71**(2): p. 371-411.
59. Habener, J.F., B. Kemper, and J.T. Potts, Jr., *Calcium-dependent intracellular degradation of parathyroid hormone: a possible mechanism for the regulation of hormone stores*. Endocrinology, 1975. **97**(2): p. 431-41.
60. Naveh-Many, T. and J. Silver, *Regulation of parathyroid hormone gene expression by hypocalcemia, hypercalcemia, and vitamin D in the rat*. J Clin Invest, 1990. **86**(4): p. 1313-9.
61. Bringham, R.F., et al., *Peripheral metabolism of PTH: fate of biologically active amino terminus in vivo*. Am J Physiol, 1988. **255**(6 Pt 1): p. E886-93.

62. Bringhurst, F.R., et al., *Metabolism of parathyroid hormone by Kupffer cells: analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography*. *Biochemistry*, 1982. **21**(18): p. 4252-8.
63. Martin, K.J., et al., *The peripheral metabolism of parathyroid hormone*. *N Engl J Med*, 1979. **301**(20): p. 1092-8.
64. Potts, J.T.J., Bringhurst, F.R., Gardella, T., Nussbaum, S, Segre, G. et Kronenberg, H., *Parathyroid hormone : physiology, chemistry, biosynthesis, secretion, metabolism and mode of action*, in *Endocrinology*, M.B. LL De Groot, HG Burger, JL Jameson, DL Loriaux, JC Marshall, WD Odell, JT Potts JR and AH Rubenstein, Editor. 1996, WB Saunders: Philadelphia. p. 920-966.
65. Rizzoli, R.E., et al., *Binding of radioiodinated parathyroid hormone to cloned bone cells*. *Endocrinology*, 1983. **113**(5): p. 1832-8.
66. Reid, I.R., et al., *Adenylate cyclase blockers dissociate PTH-stimulated bone resorption from cAMP production*. *Am J Physiol*, 1990. **258**(4 Pt 1): p. E708-14.
67. Klein, R.F., R.A. Nissenson, and G.J. Strewler, *Pertussis toxin inhibits hormonal stimulation of bone resorption in fetal rat limb bones*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1991. **258**(3): p. 877-81.
68. Civitelli, R., et al., *Heterogeneous intracellular free calcium responses to parathyroid hormone correlate with morphology and receptor distribution in osteogenic sarcoma cells*. *Endocrinology*, 1992. **130**(4): p. 2392-400.
69. Friedman, P.A., et al., *Parathyroid hormone stimulation of calcium transport is mediated by dual signaling mechanisms involving protein kinase A and protein kinase C*. *Endocrinology*, 1996. **137**(1): p. 13-20.
70. Henry, H.L., et al., *The cellular and molecular regulation of 1,25(OH)₂D₃ production*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1992. **41**(3-8): p. 401-7.
71. Massheimer, V., et al., *Effect of aging on the mechanisms of PTH-induced calcium influx in rat intestinal cells*. *J Cell Physiol*, 2000. **182**(3): p. 429-37.
72. Johnson, J.A. and R. Kumar, *Renal and intestinal calcium transport: roles of vitamin D and vitamin D-dependent calcium binding proteins*. *Semin Nephrol*, 1994. **14**(2): p. 119-28.
73. Friedman, P.A. and W.G. Goodman, *PTH(1-84)/PTH(7-84): a balance of power*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006. **290**(5): p. F975-84.
74. Williams, J.M., et al., *Parathyroid hormone-(1-34) peptide activates cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in the human placenta*. *Exp Physiol*, 1991. **76**(2): p. 297-300.
75. Reitz, R.E., et al., *Calcium, magnesium, phosphorus, and parathyroid hormone interrelationships in pregnancy and newborn infants*. *Obstet Gynecol*, 1977. **50**(6): p. 701-5.
76. Saxe, A., et al., *Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in venous umbilical cord blood of healthy neonates*. *J Perinat Med*, 1997. **25**(3): p. 288-91.

77. Thomas, A.K., R. McVie, and S.N. Levine, *Disorders of maternal calcium metabolism implicated by abnormal calcium metabolism in the neonate*. Am J Perinatol, 1999. **16**(10): p. 515-20.
78. Carella, M.J. and V.V. Gossain, *Hyperparathyroidism and pregnancy: case report and review*. J Gen Intern Med, 1992. **7**(4): p. 448-53.
79. Graham, E.M., L.J. Freedman, and I. Forouzan, *Intrauterine growth retardation in a woman with primary hyperparathyroidism. A case report*. J Reprod Med, 1998. **43**(5): p. 451-4.
80. Segre, G.V., et al., *Parathyroid Hormone in Human Plasma: IMMUNOCHEMICAL CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL IMPLICATIONS*. J Clin Invest, 1972. **51**(12): p. 3163-3172.
81. Redman, C.W.G., Sargent, I. L. et Starkey, P. M., *The human placenta : a guide for clinicians and scientists*, ed. B.s. publications. 1993, Oxford.
82. Ishikawa, E., et al., *Characterization of parathyroid hormone-related protein in the human term placenta*. Endocrinol Jpn, 1992. **39**(6): p. 555-61.
83. Barden, J.A. and B.E. Kemp, *Stabilized NMR structure of the hypercalcemia of malignancy peptide PTHrP[Ala-26](1-34)amide*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1208**(2): p. 256-62.
84. Suva, L.J., et al., *A parathyroid hormone-related protein implicated in malignant hypercalcemia: cloning and expression*. Science, 1987. **237**(4817): p. 893-6.
85. Yamamoto, S., et al., *Parathyroid hormone-related peptide-(1-34) [PTHrP-(1-34)] induces vasopressin release from the rat supraoptic nucleus in vitro through a novel receptor distinct from a type I or type II PTH/PTHrP receptor*. Endocrinology, 1997. **138**(5): p. 2066-72.
86. Gillespie, M.T. and T.J. Martin, *The parathyroid hormone-related protein gene and its expression*. Mol Cell Endocrinol, 1994. **100**(1-2): p. 143-7.
87. Clemens, T.L., et al., *Parathyroid hormone-related protein and its receptors: nuclear functions and roles in the renal and cardiovascular systems, the placental trophoblasts and the pancreatic islets*. Br J Pharmacol, 2001. **134**(6): p. 1113-36.
88. Yasuda, T., et al., *Characterization of the human parathyroid hormone-like peptide gene. Functional and evolutionary aspects*. J Biol Chem, 1989. **264**(13): p. 7720-5.
89. Mangin, M., et al., *Isolation and characterization of the human parathyroid hormone-like peptide gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(7): p. 2408-12.
90. Thiede, M.A., et al., *Human renal carcinoma expresses two messages encoding a parathyroid hormone-like peptide: evidence for the alternative splicing of a single-copy gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(13): p. 4605-9.

91. Mangin, M., K. Ikeda, and A.E. Broadus, *Structure of the mouse gene encoding parathyroid hormone-related peptide*. *Gene*, 1990. **95**(2): p. 195-202.
92. Ikeda, K., et al., *Transcription of the gene for parathyroid hormone-related peptide from the human is activated through a cAMP-dependent pathway by prostaglandin E1 in HTLV-I-infected T cells*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(2): p. 1174-9.
93. Stewart, A.F., et al., *N-terminal amino acid sequence of two novel tumor-derived adenylate cyclase-stimulating proteins: identification of parathyroid hormone-like and parathyroid hormone-unlike domains*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987. **146**(2): p. 672-8.
94. Horiuchi, N., et al., *Similarity of synthetic peptide from human tumor to parathyroid hormone in vivo and in vitro*. *Science*, 1987. **238**(4833): p. 1566-8.
95. Rodda, C.P., et al., *Evidence for a novel parathyroid hormone-related protein in fetal lamb parathyroid glands and sheep placenta: comparisons with a similar protein implicated in humoral hypercalcaemia of malignancy*. *J Endocrinol*, 1988. **117**(2): p. 261-71.
96. Shankar, P.P., et al., *Parathyroid hormone-related protein is expressed by transformed and fetal human astrocytes and inhibits cell proliferation*. *Brain Res*, 2000. **868**(2): p. 230-40.
97. Foley, J., et al., *PTHrP regulates epidermal differentiation in adult mice*. *J Invest Dermatol*, 1998. **111**(6): p. 1122-8.
98. Abbas, S.K., et al., *Stimulation of ovine placental calcium transport by purified natural and recombinant parathyroid hormone-related protein (PTHrP) preparations*. *Q J Exp Physiol*, 1989. **74**(4): p. 549-52.
99. Usdin, T.B., C. Gruber, and T.I. Bonner, *Identification and functional expression of a receptor selectively recognizing parathyroid hormone, the PTH2 receptor*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(26): p. 15455-8.
100. Rubin, D.A. and H. Juppner, *Zebrafish express the common parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor (PTH1R) and a novel receptor (PTH3R) that is preferentially activated by mammalian and fugu fish parathyroid hormone-related peptide*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(40): p. 28185-90.
101. Gensure, R.C., T.J. Gardella, and H. Juppner, *Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide, and their receptors*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **328**(3): p. 666-78.
102. Gardella, T.J. and H. Juppner, *Interaction of PTH and PTHrP with their receptors*. *Rev Endocr Metab Disord*, 2000. **1**(4): p. 317-29.
103. Gardella, T.J. and H. Juppner, *Molecular properties of the PTH/PTHrP receptor*. *Trends Endocrinol Metab*, 2001. **12**(5): p. 210-7.

104. Abou-Samra, A.B., et al., *Structure, function, and expression of the receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide*. Adv Nephrol Necker Hosp, 1994. **23**: p. 247-64.
105. Juppner, H., et al., *A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide*. Science, 1991. **254**(5034): p. 1024-6.
106. Lin, H.Y., et al., *Expression cloning of an adenylate cyclase-coupled calcitonin receptor*. Science, 1991. **254**(5034): p. 1022-4.
107. Kolakowski, L.F., Jr., *GCRDb: a G-protein-coupled receptor database*. Receptors Channels, 1994. **2**(1): p. 1-7.
108. Smock, S.L., et al., *Molecular cloning and functional characterization of the canine parathyroid hormone/parathyroid hormone related peptide receptor (PTH1)*. Mol Biol Rep, 2001. **28**(4): p. 235-43.
109. Minagawa, M., et al., *Dissection of differentially regulated (G+C)-rich promoters of the human parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor gene*. Endocrinology, 2000. **141**(7): p. 2410-21.
110. Bettoun, J.D., et al., *Methylation patterns of human parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor gene promoters are established several weeks prior to onset of their function*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **267**(2): p. 482-7.
111. Bettoun, J.D., et al., *Developmental upregulation of human parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor gene expression from conserved and human-specific promoters*. J Clin Invest, 1998. **102**(5): p. 958-67.
112. McCuaig, K.A., et al., *Parathyroid hormone/parathyroid hormone related peptide receptor gene transcripts are expressed from tissue-specific and ubiquitous promoters*. Nucleic Acids Res, 1995. **23**(11): p. 1948-55.
113. McCuaig, K.A., Clarke, J.C., White, J.H., *Molecular cloning of the gene encoding the mouse parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor*, in *Proc Acad Sci USA*. 1994. p. 5051-5055.
114. Williams, L.J. and A.B. Abou-Samra, *The transcription factors SP1 and MAZ regulate expression of the parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor gene*. J Mol Endocrinol, 2000. **25**(3): p. 309-19.
115. Urena, P., et al., *Parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor messenger ribonucleic acids are widely distributed in rat tissues*. Endocrinology, 1993. **133**(2): p. 617-23.
116. Schipani, E., et al., *Identical complementary deoxyribonucleic acids encode a human renal and bone parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor*. Endocrinology, 1993. **132**(5): p. 2157-65.
117. Jiang, B., et al., *Expression of parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor in vascular endothelial cells*. J Cardiovasc Pharmacol, 1998. **31 Suppl 1**: p. S142-4.

118. Dicker, F., et al., *Phosphorylation-independent inhibition of parathyroid hormone receptor signaling by G protein-coupled receptor kinases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(10): p. 5476-81.
119. Malecz, N., et al., *Identification of phosphorylation sites in the G protein-coupled receptor for parathyroid hormone. Receptor phosphorylation is not required for agonist-induced internalization*. Mol Endocrinol, 1998. **12**(12): p. 1846-56.
120. Blind, E., T. Bambino, and R.A. Nissenson, *Agonist-stimulated phosphorylation of the G protein-coupled receptor for parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein*. Endocrinology, 1995. **136**(10): p. 4271-7.
121. Flannery, P.J. and R.F. Spurney, *Domains of the parathyroid hormone (PTH) receptor required for regulation by G protein-coupled receptor kinases (GRKs)*. Biochem Pharmacol, 2001. **62**(8): p. 1047-58.
122. Qian, F., A. Leung, and A. Abou-Samra, *Agonist-dependent phosphorylation of the parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor*. Biochemistry, 1998. **37**(18): p. 6240-6.
123. Tawfeek, H.A., F. Qian, and A.B. Abou-Samra, *Phosphorylation of the receptor for PTH and PTHrP is required for internalization and regulates receptor signaling*. Mol Endocrinol, 2002. **16**(1): p. 1-13.
124. Castro, M., et al., *Dual regulation of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor signaling by protein kinase C and beta-arrestins*. Endocrinology, 2002. **143**(10): p. 3854-65.
125. Vilardaga, J.P., et al., *Internalization determinants of the parathyroid hormone receptor differentially regulate beta-arrestin/receptor association*. J Biol Chem, 2002. **277**(10): p. 8121-9.
126. Gennero, I., et al., *[Bone mineral metabolism: recent data and perspectives related to osteogenesis]*. Arch Pediatr, 2004. **11**(12): p. 1473-83.
127. Jansen, M., *Über atypische Chondrodystrophie (Achondroplasie) und über eine noch nicht beschriebene angeborene Wachstumsstörung des Knochensystems: Metaphysäre Dysostosis*. Zeitschr Orthop Chir., 1934. **61**: p. 253-286.
128. Blomstrand, S., I. Claesson, and J. Save-Soderbergh, *A case of lethal congenital dwarfism with accelerated skeletal maturation*. Pediatr Radiol, 1985. **15**(2): p. 141-3.
129. Usdin, T.B., et al., *Distribution of the parathyroid hormone 2 receptor in rat: immunolocalization reveals expression by several endocrine cells*. Endocrinology, 1999. **140**(7): p. 3363-71.
130. Usdin, T.B., et al., *New members of the parathyroid hormone/parathyroid hormone receptor family: the parathyroid hormone 2 receptor and tuberoinfundibular peptide of 39 residues*. Front Neuroendocrinol, 2000. **21**(4): p. 349-83.

131. Turner, P.R., et al., *Transmembrane residues together with the amino terminus limit the response of the parathyroid hormone (PTH) 2 receptor to PTH-related peptide*. J Biol Chem, 1998. **273**(7): p. 3830-7.
132. Lanske, B., et al., *PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth*. Science, 1996. **273**(5275): p. 663-6.
133. Hoare, S.R., J.A. Clark, and T.B. Usdin, *Molecular determinants of tuberoinfundibular peptide of 39 residues (TIP39) selectivity for the parathyroid hormone-2 (PTH2) receptor. N-terminal truncation of TIP39 reverses PTH2 receptor/PTH1 receptor binding selectivity*. J Biol Chem, 2000. **275**(35): p. 27274-83.
134. Rubin, D.A., et al., *A G protein-coupled receptor from zebrafish is activated by human parathyroid hormone and not by human or teleost parathyroid hormone-related peptide. Implications for the evolutionary conservation of calcium-regulating peptide hormones*. J Biol Chem, 1999. **274**(33): p. 23035-42.
135. Hoenderop, J.G., et al., *Molecular identification of the apical Ca²⁺ channel in 1, 25-dihydroxyvitamin D₃-responsive epithelia*. J Biol Chem, 1999. **274**(13): p. 8375-8.
136. Hoenderop, J.G., et al., *Function and expression of the epithelial Ca(2+) channel family: comparison of mammalian ECaC1 and 2*. J Physiol, 2001. **537**(Pt 3): p. 747-61.
137. Peng, J.B., E.M. Brown, and M.A. Hediger, *Structural conservation of the genes encoding CaT1, CaT2, and related cation channels*. Genomics, 2001. **76**(1-3): p. 99-109.
138. Moreau, R., et al., *Expression of calcium channels along the differentiation of cultured trophoblast cells from human term placenta*. Biol Reprod, 2002. **67**(5): p. 1473-9.
139. Moreau, R., et al., *Calcium uptake and calcium transporter expression by trophoblast cells from human term placenta*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1564**(2): p. 325-32.
140. Qiu, A. and C. Hogstrand, *Functional characterisation and genomic analysis of an epithelial calcium channel (ECaC) from pufferfish, Fugu rubripes*. Gene, 2004. **342**(1): p. 113-23.
141. Weber, K., et al., *Gene structure and regulation of the murine epithelial calcium channels ECaC1 and 2*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **289**(5): p. 1287-94.
142. Hoenderop, J.G., et al., *Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6*. Embo J, 2003. **22**(4): p. 776-85.
143. Anway, M.D., et al., *Expression of testicular germ cell genes identified by differential display analysis*. J Androl, 2003. **24**(2): p. 173-84.

144. Nilius, B., et al., *The single pore residue Asp542 determines Ca²⁺ permeation and Mg²⁺ block of the epithelial Ca²⁺ channel*. J Biol Chem, 2001. **276**(2): p. 1020-5.
145. Voets, T., et al., *Mg²⁺-dependent gating and strong inward rectification of the cation channel TRPV6*. J Gen Physiol, 2003. **121**(3): p. 245-60.
146. Nijenhuis, T., et al., *(Patho)physiological implications of the novel epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6*. Pflugers Arch, 2003. **446**(4): p. 401-9.
147. Wood, R.J., L. Tchack, and S. Taparia, *1,25-Dihydroxyvitamin D₃ increases the expression of the CaT1 epithelial calcium channel in the Caco-2 human intestinal cell line*. BMC Physiol, 2001. **1**: p. 11.
148. Fleet, J.C., et al., *Vitamin D-inducible calcium transport and gene expression in three Caco-2 cell lines*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002. **283**(3): p. G618-25.
149. Hoenderop, J.G., et al., *Modulation of renal Ca²⁺ transport protein genes by dietary Ca²⁺ and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in 25-hydroxyvitamin D₃-1alpha-hydroxylase knockout mice*. Faseb J, 2002. **16**(11): p. 1398-406.
150. Hoenderop, J.G., et al., *Localization of the epithelial Ca(2+) channel in rabbit kidney and intestine*. J Am Soc Nephrol, 2000. **11**(7): p. 1171-8.
151. Barley, N.F., et al., *Epithelial calcium transporter expression in human duodenum*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **280**(2): p. G285-90.
152. Tuan, R.S., *Ca²⁺-binding protein of the human placenta. Characterization, immunohistochemical localization and functional involvement in Ca²⁺ transport*. Biochem J, 1985. **227**(1): p. 317-26.
153. Arnold, B.M., et al., *Radioimmunoassay studies of intestinal calcium-binding protein in the pig. II. The distribution of intestinal CaBP in pig tissues*. Can J Physiol Pharmacol, 1975. **53**(6): p. 1135-40.
154. Harrison, J.E., A.J. Hitchman, and R.G. Brown, *Intestinal calcium-binding protein in animals fed normal and rachitogenic diets: II. Pig studies*. Can J Physiol Pharmacol, 1975. **53**(1): p. 144-9.
155. Baimbridge, K.G., J.J. Miller, and C.O. Parkes, *Calcium-binding protein distribution in the rat brain*. Brain Res, 1982. **239**(2): p. 519-25.
156. Christakos, S. and A.W. Norman, *Vitamin D₃-induced calcium binding protein in bone tissue*. Science, 1978. **202**(4363): p. 70-1.
157. Morrissey, R.L., et al., *Calcium-binding protein: its cellular localization in jejunum, kidney and pancreas*. Proc Soc Exp Biol Med, 1975. **149**(1): p. 56-60.
158. Bruns, M.E., A. Fausto, and L.V. Avioli, *Placental calcium binding protein in rats. Apparent identity with vitamin D-dependent calcium binding protein from rat intestine*. J Biol Chem, 1978. **253**(9): p. 3186-90.
159. Bruns, M.E., V. Wallshein, and D.E. Bruns, *Regulation of calcium-binding protein in mouse placenta and intestine*. Am J Physiol, 1982. **242**(1): p. E47-52.

160. Hermsdorf, C.L. and F. Bronner, *Vitamin D-dependent calcium-binding protein from rat kidney*. *Biochim Biophys Acta*, 1975. **379**(2): p. 553-61.
161. Staun, M., O. Noren, and H. Sjostrom, *Ca²⁺-binding protein from human kidney. Purification and properties*. *Biochem J*, 1984. **217**(1): p. 229-37.
162. Moncrief, N.D., R.H. Kretsinger, and M. Goodman, *Evolution of EF-hand calcium-modulated proteins. I. Relationships based on amino acid sequences*. *J Mol Evol*, 1990. **30**(6): p. 522-62.
163. Kretsinger, R.H., *Structure and evolution of calcium-modulated proteins*. *CRC Crit Rev Biochem*, 1980. **8**(2): p. 119-74.
164. Nakayama, S. and R.H. Kretsinger, *Evolution of the EF-hand family of proteins*. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 1994. **23**: p. 473-507.
165. Cao, L.P., et al., *Regulation of calbindin-D9k expression by 1,25-dihydroxyvitamin D(3) and parathyroid hormone in mouse primary renal tubular cells*. *Arch Biochem Biophys*, 2002. **400**(1): p. 118-24.
166. Li, Y.C., et al., *Effects of vitamin D receptor inactivation on the expression of calbindins and calcium metabolism*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2001. **281**(3): p. E558-64.
167. Jeung, E.B., P.C. Leung, and J. Krisinger, *The human calbindin-D9k gene. Complete structure and implications on steroid hormone regulation*. *J Mol Biol*, 1994. **235**(4): p. 1231-8.
168. Krisinger, J., et al., *Calbindin-D9k gene expression during the perinatal period in the rat: correlation to estrogen receptor expression in uterus*. *Mol Cell Endocrinol*, 1993. **97**(1-2): p. 61-9.
169. An, B.S., et al., *Mouse calbindin-D(9k) gene expression in the uterus during late pregnancy and lactation*. *Mol Cell Endocrinol*, 2003. **205**(1-2): p. 79-88.
170. An, B.S., et al., *Complex regulation of Calbindin-D(9k) in the mouse placenta and extra-embryonic membrane during mid- and late pregnancy*. *Mol Cell Endocrinol*, 2004. **214**(1-2): p. 39-52.
171. Hong, E.J., K.C. Choi, and E.B. Jeung, *Maternal-fetal transfer of endocrine disruptors in the induction of Calbindin-D9k mRNA and protein during pregnancy in rat model*. *Mol Cell Endocrinol*, 2003. **212**(1-2): p. 63-72.
172. Hershberger, M.E. and R.S. Tuan, *Placental 57-kDa Ca(2+)-binding protein: regulation of expression and function in trophoblast calcium transport*. *Dev Biol*, 1998. **199**(1): p. 80-92.
173. Kovacs, C.S. and H.M. Kronenberg, *Maternal-fetal calcium and bone metabolism during pregnancy, puerperium, and lactation*. *Endocr Rev*, 1997. **18**(6): p. 832-72.
174. Gross, B., et al., *cDNA sequence coding for a translationally controlled human tumor protein*. *Nucleic Acids Res*, 1989. **17**(20): p. 8367.
175. Chitpatima, S.T., et al., *Nucleotide sequence of a major messenger RNA for a 21 kilodalton polypeptide that is under translational control in mouse tumor cells*. *Nucleic Acids Res*, 1988. **16**(5): p. 2350.

176. Yenofsky, R., I. Bergmann, and G. Brawerman, *Messenger RNA species partially in a repressed state in mouse sarcoma ascites cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(19): p. 5876-80.
177. Thomas, G., G. Thomas, and H. Luther, *Transcriptional and translational control of cytoplasmic proteins after serum stimulation of quiescent Swiss 3T3 cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(9): p. 5712-6.
178. Sanchez, J.C., et al., *Translationally controlled tumor protein: a protein identified in several nontumoral cells including erythrocytes*. Electrophoresis, 1997. **18**(1): p. 150-5.
179. Thaw, P., et al., *Structure of TCTP reveals unexpected relationship with guanine nucleotide-free chaperones*. Nat Struct Biol, 2001. **8**(8): p. 701-4.
180. Norbeck, J. and A. Blomberg, *Metabolic and regulatory changes associated with growth of Saccharomyces cerevisiae in 1.4 M NaCl. Evidence for osmotic induction of glycerol dissimilation via the dihydroxyacetone pathway*. J Biol Chem, 1997. **272**(9): p. 5544-54.
181. Bohm, H., et al., *The growth-related protein P23 of the Ehrlich ascites tumor: translational control, cloning and primary structure*. Biochem Int, 1989. **19**(2): p. 277-86.
182. Kim, M., et al., *Identification of the calcium binding sites in translationally controlled tumor protein*. Arch Pharm Res, 2000. **23**(6): p. 633-6.
183. Bommer, U.A., et al., *The mRNA of the translationally controlled tumor protein P23/TCTP is a highly structured RNA, which activates the dsRNA-dependent protein kinase PKR*. Rna, 2002. **8**(4): p. 478-96.
184. Arcuri, F., et al., *The translationally controlled tumor protein is a novel calcium binding protein of the human placenta and regulates calcium handling in trophoblast cells*. Biol Reprod, 2005. **73**(4): p. 745-51.
185. Stauffer, T.P., et al., *Quantitative analysis of alternative splicing options of human plasma membrane calcium pump genes*. J Biol Chem, 1993. **268**(34): p. 25993-6003.
186. Strehler, E.E. and D.A. Zacharias, *Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps*. Physiol Rev, 2001. **81**(1): p. 21-50.
187. Carafoli, E., *Calcium pump of the plasma membrane*. Physiol Rev, 1991. **71**(1): p. 129-53.
188. Penniston, J.T. and A. Enyedi, *Modulation of the plasma membrane Ca²⁺ pump*. J Membr Biol, 1998. **165**(2): p. 101-9.
189. Strehler, E.E., *Recent advances in the molecular characterization of plasma membrane Ca²⁺ pumps*. J Membr Biol, 1991. **120**(1): p. 1-15.
190. Carafoli, E., *Intracellular calcium homeostasis*. Annu Rev Biochem, 1987. **56**: p. 395-433.
191. Carafoli, E., *Biogenesis: plasma membrane calcium ATPase: 15 years of work on the purified enzyme*. Faseb J, 1994. **8**(13): p. 993-1002.

192. Stauffer, T.P., D. Guerini, and E. Carafoli, *Tissue distribution of the four gene products of the plasma membrane Ca²⁺ pump. A study using specific antibodies.* J Biol Chem, 1995. **270**(20): p. 12184-90.
193. Zylinska, L., et al., *The isoform- and location-dependence of the functioning of the plasma membrane calcium pump.* Cell Mol Biol Lett, 2002. **7**(4): p. 1037-45.
194. Kozel, P.J., et al., *Balance and hearing deficits in mice with a null mutation in the gene encoding plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoform 2.* J Biol Chem, 1998. **273**(30): p. 18693-6.
195. Okunade, G.W., et al., *Targeted ablation of plasma membrane Ca²⁺-ATPase (PMCA) 1 and 4 indicates a major housekeeping function for PMCA1 and a critical role in hyperactivated sperm motility and male fertility for PMCA4.* J Biol Chem, 2004. **279**(32): p. 33742-50.
196. Penheiter, A.R., et al., *Characterization of the deafwaddler mutant of the rat plasma membrane calcium-ATPase 2.* Hear Res, 2001. **162**(1-2): p. 19-28.
197. Howard, A., S. Legon, and J.R. Walters, *Plasma membrane calcium pump expression in human placenta and small intestine.* Biochem Biophys Res Commun, 1992. **183**(2): p. 499-505.
198. Strid, H., et al., *ATP dependent Ca²⁺ transport across basal membrane of human syncytiotrophoblast in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction or diabetes.* Placenta, 2003. **24**(5): p. 445-52.
199. Strid, H. and T.L. Powell, *ATP-dependent Ca²⁺ transport is up-regulated during third trimester in human syncytiotrophoblast basal membranes.* Pediatr Res, 2000. **48**(1): p. 58-63.
200. Strid, H., et al., *Parathyroid hormone-related peptide (38-94) amide stimulates ATP-dependent calcium transport in the Basal plasma membrane of the human syncytiotrophoblast.* J Endocrinol, 2002. **175**(2): p. 517-24.
201. Blaustein, M.P. and W.J. Lederer, *Sodium/calcium exchange: its physiological implications.* Physiol Rev, 1999. **79**(3): p. 763-854.
202. Philipson, K.D. and D.A. Nicoll, *Molecular and kinetic aspects of sodium-calcium exchange.* Int Rev Cytol, 1993. **137C**: p. 199-227.
203. Donoso, P. and C. Hidalgo, *Sodium-calcium exchange in transverse tubules isolated from frog skeletal muscle.* Biochim Biophys Acta, 1989. **978**(1): p. 8-16.
204. Philipson, K.D., et al., *Molecular regulation of the Na(+)-Ca²⁺ exchanger.* Ann N Y Acad Sci, 1996. **779**: p. 20-8.
205. Nicoll, D.A., S. Longoni, and K.D. Philipson, *Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na(+)-Ca²⁺ exchanger.* Science, 1990. **250**(4980): p. 562-5.
206. Shieh, B.H., et al., *Mapping of the gene for the cardiac sarcolemmal Na(+)-Ca²⁺ exchanger to human chromosome 2p21-p23.* Genomics, 1992. **12**(3): p. 616-7.

192. Stauffer, T.P., D. Guerini, and E. Carafoli, *Tissue distribution of the four gene products of the plasma membrane Ca²⁺ pump. A study using specific antibodies.* J Biol Chem, 1995. **270**(20): p. 12184-90.
193. Zylinska, L., et al., *The isoform- and location-dependence of the functioning of the plasma membrane calcium pump.* Cell Mol Biol Lett, 2002. **7**(4): p. 1037-45.
194. Kozel, P.J., et al., *Balance and hearing deficits in mice with a null mutation in the gene encoding plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoform 2.* J Biol Chem, 1998. **273**(30): p. 18693-6.
195. Okunade, G.W., et al., *Targeted ablation of plasma membrane Ca²⁺-ATPase (PMCA) 1 and 4 indicates a major housekeeping function for PMCA1 and a critical role in hyperactivated sperm motility and male fertility for PMCA4.* J Biol Chem, 2004. **279**(32): p. 33742-50.
196. Penheiter, A.R., et al., *Characterization of the deafwaddler mutant of the rat plasma membrane calcium-ATPase 2.* Hear Res, 2001. **162**(1-2): p. 19-28.
197. Howard, A., S. Legon, and J.R. Walters, *Plasma membrane calcium pump expression in human placenta and small intestine.* Biochem Biophys Res Commun, 1992. **183**(2): p. 499-505.
198. Strid, H., et al., *ATP dependent Ca²⁺ transport across basal membrane of human syncytiotrophoblast in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction or diabetes.* Placenta, 2003. **24**(5): p. 445-52.
199. Strid, H. and T.L. Powell, *ATP-dependent Ca²⁺ transport is up-regulated during third trimester in human syncytiotrophoblast basal membranes.* Pediatr Res, 2000. **48**(1): p. 58-63.
200. Strid, H., et al., *Parathyroid hormone-related peptide (38-94) amide stimulates ATP-dependent calcium transport in the Basal plasma membrane of the human syncytiotrophoblast.* J Endocrinol, 2002. **175**(2): p. 517-24.
201. Blaustein, M.P. and W.J. Lederer, *Sodium/calcium exchange: its physiological implications.* Physiol Rev, 1999. **79**(3): p. 763-854.
202. Philipson, K.D. and D.A. Nicoll, *Molecular and kinetic aspects of sodium-calcium exchange.* Int Rev Cytol, 1993. **137C**: p. 199-227.
203. Donoso, P. and C. Hidalgo, *Sodium-calcium exchange in transverse tubules isolated from frog skeletal muscle.* Biochim Biophys Acta, 1989. **978**(1): p. 8-16.
204. Philipson, K.D., et al., *Molecular regulation of the Na(+)-Ca²⁺ exchanger.* Ann N Y Acad Sci, 1996. **779**: p. 20-8.
205. Nicoll, D.A., S. Longoni, and K.D. Philipson, *Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na(+)-Ca²⁺ exchanger.* Science, 1990. **250**(4980): p. 562-5.
206. Shieh, B.H., et al., *Mapping of the gene for the cardiac sarcolemmal Na(+)-Ca²⁺ exchanger to human chromosome 2p21-p23.* Genomics, 1992. **12**(3): p. 616-7.

207. Li, Z., et al., *Cloning of the NCX2 isoform of the plasma membrane Na(+)-Ca²⁺ exchanger*. J Biol Chem, 1994. **269**(26): p. 17434-9.
208. Nicoll, D.A., et al., *Cloning of a third mammalian Na⁺-Ca²⁺ exchanger, NCX3*. J Biol Chem, 1996. **271**(40): p. 24914-21.
209. Matsuoka, S., et al., *Initial localization of regulatory regions of the cardiac sarcolemmal Na(+)-Ca²⁺ exchanger*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(9): p. 3870-4.
210. Quednau, B.D., D.A. Nicoll, and K.D. Philipson, *Tissue specificity and alternative splicing of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger isoforms NCX1, NCX2, and NCX3 in rat*. Am J Physiol, 1997. **272**(4 Pt 1): p. C1250-61.
211. Nakasaki, Y., et al., *Cloning of the rat aortic smooth muscle Na⁺/Ca²⁺ exchanger and tissue-specific expression of isoforms*. J Biochem (Tokyo), 1993. **114**(4): p. 528-34.
212. Schulze, D.H., et al., *Alternative splicing of the Na(+)-Ca²⁺ exchanger gene, NCX1*. Ann N Y Acad Sci, 1996. **779**: p. 46-57.
213. Nicoll, D.A., et al., *A new topological model of the cardiac sarcolemmal Na⁺-Ca²⁺ exchanger*. J Biol Chem, 1999. **274**(2): p. 910-7.
214. Quednau, B.D., D.A. Nicoll, and K.D. Philipson, *The sodium/calcium exchanger family-SLC8*. Pflugers Arch, 2004. **447**(5): p. 543-8.
215. Azarani, A., J. Orłowski, and D. Goltzman, *Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide activate the Na⁺/H⁺ exchanger NHE-1 isoform in osteoblastic cells (UMR-106) via a cAMP-dependent pathway*. J Biol Chem, 1995. **270**(39): p. 23166-72.
216. Cho, C.H., et al., *Partial rescue of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger (NCX1) knock-out mouse by transgenic expression of NCX1*. Exp Mol Med, 2003. **35**(2): p. 125-35.
217. Kofuji, P., et al., *Expression of the Na-Ca exchanger in diverse tissues: a study using the cloned human cardiac Na-Ca exchanger*. Am J Physiol, 1992. **263**(6 Pt 1): p. C1241-9.
218. Moreau, R., L. Simoneau, and J. Lafond, *Calcium fluxes in human trophoblast (BeWo) cells: calcium channels, calcium-ATPase, and sodium-calcium exchanger expression*. Mol Reprod Dev, 2003. **64**(2): p. 189-98.
219. Williams, J.M., et al., *Inhibitor action on placental calcium transport*. Calcif Tissue Int, 1991. **48**(1): p. 7-12.
220. Moreau, R., et al., *Expression and role of calcium-ATPase pump and sodium-calcium exchanger in differentiated trophoblasts from human term placenta*. Mol Reprod Dev, 2003. **65**(3): p. 283-8.
221. Kovacs, C.S., *PTHrP gene knock out mouse have placental calcium transport severely impaired*. J. Bone Miner, 1995. **10**(73).
222. Greer, F.R., *Calcium, phosphorus, magnesium and the placenta*. Acta Paediatr Suppl, 1994. **405**: p. 20-4.

223. Belkacemi, L., L. Simoneau, and J. Lafond, *Calcium-binding proteins: distribution and implication in mammalian placenta*. *Endocrine*, 2002. **19**(1): p. 57-64.
224. Schuh, K., et al., *Interaction of the plasma membrane Ca²⁺ pump 4b/CI with the Ca²⁺/calmodulin-dependent membrane-associated kinase CASK*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(11): p. 9778-83.
225. Kronenberg, H.M., F. R. Bringhurst, S. Nussbaum, H. Jüppner, A. B. Abou-Samra, G. V. Segre, and J. T. Potts Jr., *Parathyroid hormone: biosynthesis, secretion, chemistry, and action*, in *Handbook of Experimental Pharmacology*, K.J. G. R. Mundy and T. J. Martin, Editor. 1993, *Physiology and Pharmacology of Bone*: Heidelberg. p. 185-201.
226. Potts, J.T., Jr., and H. Jüppner, *Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in calcium homeostasis, bone metabolism, and bone development: the proteins, their genes, and receptors*, in *Metabolic Bone Disease*, L.V.A.a.S.M. Krane, Editor. 1997: New York. p. 51-94.
227. Jouishomme, H., et al., *Further definition of the protein kinase C activation domain of the parathyroid hormone*. *J Bone Miner Res*, 1994. **9**(6): p. 943-9.
228. Rixon, R.H., et al., *Parathyroid hormone fragments may stimulate bone growth in ovariectomized rats by activating adenyl cyclase*. *J Bone Miner Res*, 1994. **9**(8): p. 1179-89.
229. Jouishomme, H., et al., *The protein kinase-C activation domain of the parathyroid hormone*. *Endocrinology*, 1992. **130**(1): p. 53-60.
230. Fujimori, A., et al., *Structure-function relationship of parathyroid hormone: activation of phospholipase-C, protein kinase-A and -C in osteosarcoma cells*. *Endocrinology*, 1992. **130**(1): p. 29-36.
231. Tashjian, A.H., Jr. and R.F. Gagel, *Teriparatide [human PTH(1-34)]: 2.5 years of experience on the use and safety of the drug for the treatment of osteoporosis*. *J Bone Miner Res*, 2006. **21**(3): p. 354-65.
232. Garel, J.M., *Distribution of labeled parathyroid hormone in rat fetus*. *Horm Metab Res*, 1972. **4**(2): p. 131-2.
233. Rubin, L.P., et al., *Circulating levels of biologically active and immunoreactive intact parathyroid hormone in human newborns*. *Pediatr Res*, 1991. **29**(2): p. 201-7.
234. Kronenberg, H.M., *PTHrP and skeletal development*. *Ann N Y Acad Sci*, 2006. **1068**: p. 1-13.
235. Senior, P.V., D.A. Heath, and F. Beck, *Expression of parathyroid hormone-related protein mRNA in the rat before birth: demonstration by hybridization histochemistry*. *J Mol Endocrinol*, 1991. **6**(3): p. 281-90.
236. Care, A.D., et al., *The effect of fetal thyroparathyroidectomy on the transport of calcium across the ovine placenta to the fetus*. *Placenta*, 1986. **7**(5): p. 417-24.
237. Rodda C.P., C.I.W., Martin T.J., *Role of the PTHrP in fetal and neonatal*

- physiology in Parathyroid Hormone-Related Protein: Physiology and its role in cancer.*, H.B.P. Nissenson R.A., Editor. 1992, CRC Press: Boca Raton, FL. p. 169.
238. Everhart-Caye, M., et al., *Parathyroid hormone (PTH)-related protein(1-36) is equipotent to PTH(1-34) in humans.* J Clin Endocrinol Metab, 1996. **81**(1): p. 199-208.
 239. Fraher, L.J., et al., *A comparison of the in vivo biochemical responses to exogenous parathyroid hormone-(1-34) [PTH-(1-34)] and PTH-related peptide-(1-34) in man.* J Clin Endocrinol Metab, 1992. **75**(2): p. 417-23.
 240. Kemp, B.E., et al., *Parathyroid hormone-related protein of malignancy: active synthetic fragments.* Science, 1987. **238**(4833): p. 1568-70.
 241. Inomata, N., et al., *Characterization of a novel parathyroid hormone (PTH) receptor with specificity for the carboxyl-terminal region of PTH-(1-84).* Endocrinology, 1995. **136**(11): p. 4732-40.
 242. Pines, M., et al., *Generation and characterization of human kidney cell lines stably expressing recombinant human PTH/PTHrP receptor: lack of interaction with a C-terminal human PTH peptide.* Endocrinology, 1994. **135**(4): p. 1713-6.
 243. Takasu, H., et al., *The 69-84 amino acid region of the parathyroid hormone molecule is essential for the interaction of the hormone with the binding sites with carboxyl-terminal specificity.* Endocrinology, 1996. **137**(12): p. 5537-43.
 244. Segre, G.V., *Receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein*, in *Principles in Bone Biology*, L.G.R. J. P. Bilezikian, and G. A. Rodan, Editor. 1996: New York. p. 377-403.
 245. Okano, T., et al., *Regulation of gene expression of epithelial calcium channels in intestine and kidney of mice by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3.* J Steroid Biochem Mol Biol, 2004. **89-90**(1-5): p. 335-8.
 246. Xu, A., A.R. Bellamy, and J.A. Taylor, *Expression of translationally controlled tumour protein is regulated by calcium at both the transcriptional and post-transcriptional level.* Biochem J, 1999. **342 Pt 3**: p. 683-9.
 247. Rao, K.V., et al., *Cloning and characterization of a calcium-binding, histamine-releasing protein from Schistosoma mansoni.* J Biol Chem, 2002. **277**(34): p. 31207-13.
 248. Gnanasekar, M., et al., *Molecular characterization of a calcium binding translationally controlled tumor protein homologue from the filarial parasites Brugia malayi and Wuchereria bancrofti.* Mol Biochem Parasitol, 2002. **121**(1): p. 107-18.
 249. Arcuri, F., et al., *Translationally controlled tumor protein (TCTP) in the human prostate and prostate cancer cells: expression, distribution, and calcium binding activity.* Prostate, 2004. **60**(2): p. 130-40.
 250. Zoccola, D., et al., *Molecular cloning and localization of a PMCA P-type calcium ATPase from the coral Stylophora pistillata.* Biochim Biophys Acta, 2004. **1663**(1-2): p. 117-26.

251. Linck, B., et al., *Functional comparison of the three isoforms of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX1, NCX2, NCX3)*. Am J Physiol, 1998. **274**(2 Pt 1): p. C415-23.
252. Kamath, S.G. and C.H. Smith, *Na⁺/Ca²⁺ exchange, Ca²⁺ binding, and electrogenic Ca²⁺ transport in plasma membranes of human placental syncytiotrophoblast*. Pediatr Res, 1994. **36**(4): p. 461-7.
253. van Abel, M., et al., *Age-dependent alterations in Ca²⁺ homeostasis: role of TRPV5 and TRPV6*. Am J Physiol Renal Physiol, 2006. **291**(6): p. F1177-83.
254. Moreau, R., L. Simoneau, and J. Lafond, *Characteristics of calcium uptake by BeWo cells, a human trophoblast cell line*. Placenta, 2001. **22**(8-9): p. 768-75.
255. Smith, N.C., M.G. Brush, and S. Lockett, *Preparation of human placental villous surface membrane*. Nature, 1974. **252**(5481): p. 302-3.
256. el Mabrouk, M., et al., *Asymmetrical distribution of G proteins in syncytiotrophoblastic brush-border and basal-plasma membranes of human term placenta*. Placenta, 1996. **17**(7): p. 471-7.
257. Potts, J.T., Jr;Bringham, F R.;Gardella, T.;Nussbaum, S.;Segre, G.; Kronenberg, H., *Endocrinology*, D.L. J., Editor. 1995, Saunders: Philadelphia. p. 920–966.
258. Lafond, J. and L. Simoneau, *Calcium homeostasis in human placenta: role of calcium-handling proteins*. Int Rev Cytol, 2006. **250**: p. 109-74.
259. Bowden, S.J., et al., *Parathyroid hormone-related protein in human term placenta and membranes*. J Endocrinol, 1994. **142**(2): p. 217-24.