

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

EFFET D'EXTRAITS DE PLANTES MEDICINALES SUR LA DIFFERENCIATION
CELLULAIRE ET LE TRANSPORT DU CALCIUM PAR LES CELLULES
SYNCYTIOTROPHOBLASTE-*LIKE* HUMAINES

THÈSE

PRÉSENTÉE

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DU DOCTORAT EN BIOLOGIE

PAR

ALINE OLIVEIRA DA CONCEIÇÃO

Mars 2010

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse 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.»

*'Qui ose alimenter la Bête qui, rampant
vers le haut, cherche l'aliment oublié?*

*Comment rencontrer le sévère maître
invisible qui nous guidera vers notre lieu
d'origine?*

*Suffit-il d'une barque, d'un puits, d'un
pont, de deux ailes d'os, pour atteindre
l'étrange lisière?*

*Incapables de se connaître eux-mêmes les
anges transmettent une lumière qui n'est
pas la leur.'*

Alexandro Jodorowsky

REMERCIEMENTS

D'abord, un grand merci à ma directrice de recherche, Dr Julie Lafond, qui m'a laissé toute la liberté nécessaire à l'accomplissement de mes travaux. J'espère que cette thèse sera un remerciement suffisant au soutien et à la confiance dont elle a fait preuve à mon égard.

Merci aussi à Maude Éthier-Chiasson du Laboratoire de Physiologie Materno-fœtale, à Frédérique Lebellego, à Sophie Haché, Mirianne Lemire, George Daoud, Lucie Simoneau, Charles Marseille ainsi que tous les étudiants(es) qui j'ai côtoyés au *labo*. Merci pour les conseils techniques, le partage de la bench et, surtout, la patience nécessaire pour me comprendre, psychologiquement parlant parfois, linguistiquement parlant souvent. Un merci tout spécial à Marie-Claude Charest pour son inestimable apport lors de l'écriture de mes articles.

Merci aux nombreux chercheurs du BioMed et à leurs équipes qui ont partagé leurs connaissances et, bien sûr, le matériel nécessaire à la réalisation de ce projet. Je pense plus particulièrement aux laboratoires de Benoît Barbeau, Catherine Mounier, Cathy Vaillancourt et Éric Rassart. Un merci tout spécial à Murielle Apka, fabuleuse lionne.

Merci à mes collègues de l'Universidade Estadual de Santa Cruz: Luis Alberto Mattos, Célio Kersul et Fernando Faustino pour le support donné à très longue distance. Merci aussi à Joilda Nery qui a participé à la cueillette des échantillons de jenipapo utilisées dans ma recherche.

Merci à Isabelle Poudrier, la collègue qui m'a le plus aidé dans mon travail et, surtout, la douce amie à qui je dois tant de beaux et joyeux moments durant mon séjour à Montréal.

Merci à mes trois amies, véritables anges gardiens, Mônica M. Pires, Ingrid R. Moron (*in memoriam*) et Moema Midlej. Leur aide et leur lumière ont fait toute la différence pendant ces quatre années et demie.

Merci à ma sœur, amie et source profonde d'inspiration, Simone Conceição. Merci de l'irremplaçable et inconditionnel soutien.

Enfin, plus qu'un remerciement, je dédie cette thèse à mes parents Gradir et João Pedro (*in memoriam*), à mes deux chattes Paixão et Vida, qui sont pour moi plus que des animaux, et à mon époux, Richard Chartier, qui ensemble formez la plus merveilleuse des familles, sans laquelle ce projet n'aurait jamais pu être mené jusqu'au bout. Merci Richard, mon bel amour, merci de m'avoir tenu la main jusqu'aux dernières lignes de cette thèse. Merci d'être là tous les jours, un jour à la fois...

À tous les anges qui m'ont aidé d'une manière ou d'une autre dans ce parcours, ceux auxquels je pense, mais aussi ceux que j'ai pu oublier et j'espère que ceux-là se reconnaîtront: un grand merci!

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES TABLEAUX	xx
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xxi
RESUMÉ.....	xxvii
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1	6
ÉTAT DES CONNAISSANCES.....	6
1.1 Le placenta humain.....	6
1.1.1. La formation du placenta	7
1.1.2. La voie des protéines kinases activées par des mitogènes (mitogen-activated protein kinases, MAPK).....	14
1.1.3. Les voies de MAPK et la régulation de la durée du signal – activation soutenue et transitoire.....	26
1.1.4. Les inhibiteurs de MAPK.....	27
1.1.5. La voie de l'AMP cyclique	30
1.1.6. <i>Cross-talk</i> entre différentes voies de signalisation	37
1.1.7. Les fonctions du placenta.....	37
1.2 La biologie des plantes médicinales	59
1.2.1. Les terpènes et stéroïdes	64
1.2.2. Les composés phénoliques ou polyphénols.....	66
1.2.3. Alcaloïdes.....	66
1.3. Les plantes médicinales et le système cellulaire des mammifères	67
1.4. Les cellules <i>trophoblast-like</i> comme modèles <i>in vitro</i> pour le placenta.....	76
CHAPITRE 2	79

PREMIER ARTICLE	79
Avant-propos.....	79
2.1. Abstract.....	82
2.2. Introduction.....	83
2.3. Material and Methods	85
2.3.1. Materials.....	85
2.3.2. Cell line and cell viability	86
2.3.3. hCG production	87
2.3.4. Ca ²⁺ uptake	87
2.3.5. Effect of SJW and hypericin on Ca ²⁺ transport proteins expression.....	88
2.3.6. mRNA expression quantification.....	88
2.3.7. Statistical analysis.....	89
2.4. Results and discussion	90
2.4.1. Effect of SJW on cell viability.....	90
2.4.2. Effect of SJW and hypericin on trophoblast biochemical differentiation	90
2.4.3. Effect of SJW and hypericin on trophoblast Ca ²⁺ transport	91
2.4.4. Effect of SJW and hypericin on Ca ²⁺ transport protein expression.....	93
2.6. Legend of figures.....	96
CHAPITRE 3	105
DEUXIÈME ARTICLE	105
Avant-propos.....	105
3.1. Abstract.....	108
3.2. Introduction.....	109
3.3. Material and Methods	111
3.3.1. Plant material.....	111
3.3.2. Phytochemical analysis	112
3.3.3. Cell line	113
3.3.4. Cell viability/proliferation	113

3.3.5. hCG production	113
3.3.6. Morphological evaluation of trophoblast differentiation by immunofluorescence assay	114
3.3.7. cAMP measurement.....	115
3.3.8. Trophoblast differentiation/proliferation cell signaling pathway	115
3.3.9. Statistical analysis.....	117
3.4. Results.....	118
3.4.1. Phytochemical analysis	118
3.4.2. Cell viability/proliferation	118
3.4.3. Effect of <i>G. americana</i> fruit on biochemical trophoblast-like cell differentiation	119
3.4.4. Effect of <i>G. americana</i> on morphological trophoblast-like cell differentiation .	119
3.4.5. Monitoring cAMP production	120
3.4.6. Effect of <i>G. americana</i> fruit on MAPK activation in trophoblast-like cells	120
3.5. Discussion	121
3.6. Acknowledgements	126
3.7. Legends of figures	127
CHAPITRE 4	135
TROISIÈME ARTICLE.....	135
Avant-propos.....	135
4.1. Abstract.....	138
4.2. Introduction.....	139
4.3. Material and methods	141
4.3.1. Plant material.....	141
4.3.2. Phytochemical analysis	142
4.3.3. Plant material preparation	142
4.3.4. Cell lines.....	142
4.3.5. Cell viability/proliferation.....	143

4.3.6. hCG production	143
4.3.7. Morphological evaluation of trophoblast differentiation by immunofluorescence assay	143
4.3.8. cAMP measurement.....	144
4.3.9. Trophoblast differentiation/proliferation cell signaling pathway	145
4.3.10. Ca ²⁺ uptake	147
4.3.11. Effect of <i>L. macrophylla</i> on Ca ²⁺ transport protein expression	148
4.3.12. Statistical analysis.....	150
4.4. Results and discussion	151
4.5. Conclusion	158
4.6. Legends of figures	159
CHAPITRE 5	175
DISCUSSION GÉNÉRALE.....	175
ANNEXE I.....	185
ANNEXE II
REFÉRENCES.....	186

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
<p>1.1 Principales voies de différenciation du cytotrophoblaste (CT). (Tirée de Malassine, 1999.).....</p>	7
<p>1.2 Les villosités chorioniques et les couches qui forment la barrière placentaire. La barrière placentaire est initialement composée de 4 couches: l'endothélium vasculaire fœtal, le tissu conjonctif ou mésenchyme, le cytotrophoblaste et le syncytium. (Adaptée de Rossant et Cross, 2001.).....</p>	8
<p>1.3 Exemples de facteurs de régulation de la différenciation du trophoblaste. Le signe «+» (plus) indique une stimulation et le signe «-» (moins) indique une inhibition. AMP adenosine monophosphate; IGF-1, <i>insuline-like growth facteur-1</i>; CSF-1, <i>colony-stimulating factor-1</i>; GM, <i>granulocyte/macrophage</i>; EGF, <i>epidermal growth factor</i>; TGFβ, <i>transforming growth factor beta</i>; hCG, <i>chorionic gonadotrophin</i>; LIF, <i>leukemia inhibitory factor</i>; IL, <i>interleukine</i>. (Adaptée de Handwerker et Aronow, 2003.).....</p>	9
<p>1.4 Régulation de la différenciation placentaire et sécrétion des hormones hCG et hPL par les facteurs de croissance. Les cytokines comme le facteur 1 stimulant la croissance des colonies (CSF-1, <i>colony-stimulating factor</i>) et le CSF de granulocyte/macrophage (GM-CSF) peuvent modifier la sécrétion hormonale (indiqué par les fleches rouge) sans nécessairement moduler la fusion cellulaire. (Tirée de Morrish et al., 1998.).....</p>	11
<p>1.5 Module de signalisation principal de la voie de MAPK. La formation basique de la voie de MAPK correspond à un module de trois kinases suivant une action séquentielle (Adapté de Widmann et al. 1999). L'activité des MAPK est contrôlée par la phosphorylation de deux résidus tyrosine – 185 (Y185) et thréonine – 183 (T183) qui sont à la surface de la boucle d'activation.....</p>	15
<p>1.6 Les voies des MAPK. La réponse biologique à un stimulus extracellulaire par la voie de MAPK est achevée par une cascade de signalisation impliquant trois kinases activées en série suite au stimulus. L'activation d'une MAP kinase</p>	

- kinase kinase (MAPKKK) va activer une MAP kinase kinase (MAPKK) qui va, à son tour, activer une MAP kinase (MAPK). La spécificité de la réponse cellulaire est modulée par la sélectivité du substrat comme les facteurs de transcription et les MK (*MAPK activated protein kinases*) et par certaines caractéristiques des événements ultérieurs. (Adaptée de Garrington et Johnson, 1999.)..... 18
- 1.7 Structure tridimensionnelle d'ERK2 (MAPK).** P-Thr-183 (threonine 183 phosphorylée) et P-Tyr-185 (thyrosine 185 phosphorylée) représentent respectivement les sites de phosphorylation Y185 et Y183 et se localisent dans la boucle d'activation. Le schéma montre aussi le lieu d'insertion de MAPK, le domaine CD (*common docking*) et l'extension C-terminal L16. (Tirée de Chen et al., 2001.)..... 20
- 1.8 Régulation de la cascade d'ERK par Ras.** Une voie linéaire, dont Ras module les voies en aval aux récepteurs de tyrosine kinases (RTKs) et les voies en amont constitué du complexe Raf>MEK>MAPK, ce qui constitue un pont entre la surface cellulaire et le noyau. (Tirée de Campbell et al., 1998.)..... 22
- 1.9 Structure d'un inhibiteur de p38 (SB203580) et d'un inhibiteur de la voie de MEK1/2 (PD98059).** Tirée de Cuenda et collègues (1995) et Alessi et collègues (1995)..... 27
- 1.10 La régulation de l'AC est particulière à chaque isoforme. A)** Schéma de régulation d'AC1 (également valide pour AC3 et AC8). R1 représente le récepteur de protéine G (ou récepteur β_2 adrénergique) qui se lie à $G\alpha_s$, R2 représente les récepteurs de protéine G (récepteurs muscariniques M-2 et α_1 adrénergique) qui se lient à la protéine $G\alpha_i$. **B)** Schéma de régulation de l'AC2. La régulation de l'AC2 (également valide pour AC4 et AC7) par $G\beta\gamma$ est dépendante de la coactivation de $G\alpha_s$. PKC peut utiliser AC comme substrat, ce qui entraînera l'élévation de l'activité basale et l'inhibition de la super activation par $G\beta\gamma$. **C)** Schéma de régulation de l'AC5. Le signal « + » représente une activation et le signal « - » représente une inhibition. PKA – protéine kinase A; PKC – protéine kinase C; CaM – calmoduline; CaMK – calmoduline-dépendante de kinase; NO – *nitric oxide*; VDCC – *voltage-dependent Ca²⁺ channel*). (Tirée de Sunahara et Taussig, 2002)..... 31
- 1.11 Formation du complexe multiprotéique de la voie de l'AMPC-PKA.** Le complexe qui donne la versatilité et la spécificité de la voie de la PKA (*protéine kinase A*) est formé des AC activées donnant origine à un *pool* d'AMPC, de PDE (phosphodiesterases) et d'AKAP (*A kinase anchoring*..... 34

- proteines*). (Tirée de Tasken et Aandahl, 2004.)
- 1.12 Représentation du système de transport de Ca^{2+} par le syncytiotrophoblaste (ST) humain.** AC, *adenylyl cyclase*; cAMP, *cyclic adenosine monophosphate*; ATP, *adenosine triphosphate*; Ca^{2+} , *ion calcium*; CaBP, *calcium-binding proteins*; CT, *calcitonin receptor*; DAG, *diacylglycerol*; G, *protéine G*; IP3, *inositol-1,4,5-triphosphate*; PKA, *protein kinase A*; PKC, *protein kinase C*; PLC, *phospholipase C*; PTH1R, *parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor*; PTHrP *mid-molecule, probable récepteur qui se lie au fragment intermédiaire de la PTHrP*; TRPV, *transient receptor potential, vanilloid family*. (Tirée de Lafond et Simoneau, 2006.)..... 40
- 1.13 Mécanisme de régulation des SOC par le signal provenant des organelles telles que la mitochondrie et le réticulum endoplasmique (RE), responsables du tamponnage de Ca^{2+} .** IP3, *inositol phosphate 3*. Les SOC sont activés par le signal provenant du RE. La capacité tamponante de Ca^{2+} du RE et de la mitochondrie aide l'activation de SOC à travers le tamponement du Ca^{2+} proche à l'entrée du canal. De plus, la mitochondrie située proche au récepteur de InsP3 du RE tamponne la sortie du Ca^{2+} et réduit l'inhibition de la libération du Ca^{2+} par les canaux de récepteur de InsP3. Finalement, la mitochondrie 'energisée' semble (?) être capable de réguler positivement la fonction des SOC par un mécanisme indépendante de Ca^{2+} (Tirée de Parekh et Putney, 2005.)..... 43
- 1.14 Organisation structurale des TRPV-5 et TRPV-6.** Ces canaux sont constitués d'un domaine principal formé par 6 segments transmembranaires (TM), d'une région formatrice du pore entre TM5 et TM6 et de deux longues queues amine (NH_2) et carboxyle ($COOH$) situées dans le cytosol. A: structure tertiaire et localisation transmembranaire; B: structure primaire et indication des probables sites de régulations présents dans les terminaisons NH_2 et $COOH$ comme les répétitions ankyrine, les motifs PDZ et les éventuels sites de phosphorylation par PKC (sphères bleues) (Tirée de Hoenderop et al., 2005.)..... 44

- 1.15 Modèle intégré de transport actif du Ca^{2+} dans la cellule épithéliale et régulation des TRPV-5 et -6.** 1) Liaison des hormones calciotropiques telles que la Vitamine D, la PTH (*parathyroid hormone*) et l'estrogène; 2) Activité dépendante du pH et du Ca^{2+} ; 3) Transfert des molécules (*trafficking*) vers la membrane cellulaire; 4) Association de différentes protéines comme Calbindin-D (A), Klotho (B) et BSPRY (*B-box ans SPRY-domain-containing protein*) (C). (Tirée de Schoeber et al., 2007.)..... 46
- 1.16 Modèle computationnel de la forme « holo » de la CaBP28k.** Les résidus marqués en rouge (Lys34, Lys152, Lys161, His5, His22) et en vert (Lys180 et Lys185) sont responsables des changements de la réactivité et de la conformation suite à la liaison au Ca^{2+} (sphères bleues). Les *EF hands* 1, 3, 4 et 5 sont aussi représentés. (Tirée de Hobbs et al., 2009.)..... 50
- 1.17 Séquence conservée et identification des séquences fonctionnelles de la TCTP chez différentes espèces. Residus invariable sont marqué en rouge; Residus conservés sont marqué en rose; Sequence de résidus de la souris qui coïncident avec les residus de liaison à la tubuline chez l'humain sont marqué en bleu; Residus de serine possible de phosphorylation sont marqué en vert. Feuillet β : fleches jaunes; Hélices : barres oranges; Region de boucle flexible : ligne grise; site de liaison à microtubules : barre bleu; site de liaison au Ca^{2+} : barre verte; signature de TCT : barre rose. (Adaptée de Bommer et Thiele, 2004.)..... 52**
- 1.18 Schéma de la topologie de la PMCA et des protéines de liaison.** L'interaction avec la plupart des protéines partenaires est située dans le domaine PDZ de l'extrémité carboxyle (C). D'autres protéines se lient à travers l'extrémité amine (N) et la boucle principale intracellulaire. Les sites d'interaction avec la calmoduline (CaM-BD), le domaine de liaison à PDZ (PDZ BD), et les domaines de liaison aux phospholipides (PL BD) sont aussi représentés. CaN: calcineurine. (Tirée de Di Leva et collègues, 2008.)..... 56
- 1.19 Biosynthèse des substances originaires du métabolisme secondaire et quelques exemples de leurs applications pharmacologiques.** (Adaptée de Santos, 1999.)..... 59
- 1.20 Exemples de substances d'origine végétale.** Ces substances peuvent être classifiées en trois groupes principaux selon leur caractéristique structurale: les terpènes et stéroïdes (A et B), les polyphénols (C) et les alcaloïdes (D). (Adaptée de Simões et al., 1999.)..... 61

- 1.21 L'isoprène (IPP) constitue la base de formation des terpènes et stéroïdes.** (Tirée de Simões et al., 1999.)..... 62
- 2.1 Dose-dependent effect of SJW on JEG-3 cells viability. MTT technique was used and results were expressed in percentage of controls (CTL) (A).** JEG-3 cells were fixed and stained with propidium iodide (PI) for nuclei and with a specific antibody for plasma membrane desmosomes (green). Images represent not altered JEG-3 cells treated with DMSO (B) and cells treated with SJW at 75 µg/mL (C). Microscopic examination showed cell vacuolization and nuclei displacement (white arrows). Cells were observed by confocal microscopy (Original magnification 400X). MTT data are representative of 5 experiments made in quadruplicate. Student's *t* test; **p*<0.05 ****p*<0.0001..... 96
- 2.2 Effect of SJW (25 µg/mL) or hypericin (7.5 and 75 ng/mL) on hCG production.** Control (CTL) consisted of cells treated with DMSO only or forskolin (FKL) at 50 µM. Data represent mean±SEM of 3 individual experiments made in duplicate. Control cells were reported to the same ratio value of 1.0. One-way ANOVA was followed by Tukey's multiple comparison test; *** *p*<0.0001..... 97
- 2.3 Effect of SJW at 25 µg/mL (◯) or hypericin at 7.5 ng/mL (▽) and 75 ng/mL (▽) on JEG-3 cells Ca²⁺ uptake.** Cells were pretreated for 24 h (A and B) and 10 min (C) with SJW, hypericin and controls. The Ca²⁺ uptake was done at different time points (0 to 20 min) using ⁴⁵Ca²⁺. Control (CTL) consisted of cells treated with DMSO (<0,01%)(◼), forskolin (FKL) at 50 µM(◊) or ruthenium red (RR) (◈). The Ca²⁺ uptake were expressed as nmol of Ca²⁺ per mg of cellular proteins. Linear (A) and non-linear (B) phase are shown. Data represent mean±SEM of 3 (C) to 5 (A and B) individual experiments made in duplicate. One-way ANOVA test followed by Tukey's multiple comparison test (*p*<0.05; * SJW vs CTL; ◊FKL vs CTL; #7.5 ng/mL vs CTL; ε75 ng/mL vs CTL) and test *t* (**p*<0,05; ***p*<0,01; RR vs CTL) were used to analyze each time point..... 98,98
- 2.4 Effect of SJW at 25 µg/mL or hypericin at 7.5 ng/mL and 75 ng/mL treatment on Ca²⁺ transport proteins TCTP (A), CaBP28 (B), PMCA1/4 (C), and TRPV-6 (D) expression in JEG-3 cells by Western blot.** Results were expressed as a ratio of control cells which consisted of cells treated with DMSO only (CTL) or forskolin (FKL) at 50 µM. Data from 5 (CaBP28, n=3) different experiments were compared and analyzed with paired *t* test (*p*<0.05;*vs CTL; ◊vs FKL; *p*=0.0080;** vs CTL)..... 100

- 2.5 Effect of SJW at 25 µg/mL or hypericin at 7.5 ng/mL and 75 ng/mL treatment on Ca²⁺ transport proteins TCTP (A), PMCA-1 (B), PMCA-4 (C), and TRPV-6 (D) mRNA expression in JEG-3 cells by semi quantitative Real-time PCR.** Control (CTL) consisted of cells treated with DMSO only or forskolin (FKL) at 50 µM. Results are expressed by the normalized ratio of each sample using ribosomal gene 18S as reference. Data represent mean±SEM from 3 different treatments..... 101
- 3.1 Cell viability/proliferation effect of *G. americana* in human choriocarcinoma cell line (BeWo) measured by WST-1 colorimetric assay.** BeWo cells were treated with a) different concentrations of *G. americana* (Gen) plant extract (50 to 500 µg/mL), b) plant extracts + forskolin (FKL) (50 µM) (A), or c) plant extract at 50 or 500 µg/mL + MAPK inhibitors PD 98050 (PD) and SB203580 (SB) (B) and verified by WST-1 technique. Controls consisted of cells treated with DMSO only (CTL) (< 0.5%), hydrogen peroxyde (H₂O₂) and forskolin (FKL) (50 µM). Data are representative of 3 experiments made in duplicate. Results are expressed in percentage of DMSO control cells. Statistical analysis were done using One way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison tests and Student's *t* test; *p<0.05; **p<0.005; ***p<0.0005..... 127
- 3.2 Effect of *G. americana* on trophoblast-like cells differentiation.** Biochemical differentiation was verified by measuring the production of the differentiation marker, the human chorionic gonadotrophin (hCG) hormone, in the supernatant and values are expressed as mIU/mg (A); Morphological differentiation was measured by counting multi-nucleated cells (syncytia). A syncytium was defined as three or more nuclei (red) in the same cytoplasm without intervening surface desmosomal membrane (green) staining (B; a-h). The syncytium counting was performed in 5 microscopic fields per well taken randomly and results are expressed as a number of syncytium counted (C). All observations were performed at 20X magnification on monolayer cells. Treatment consisted of *G. americana* (Gen) plant extract or plant extract + forskolin (FKL) (50 µM). Control consisted of cells treated with DMSO only (CTL) or cells were treated with 50 µM forskolin (FKL). Data represent mean±SEM of 3 individual experiments made in duplicate. Statistical analysis were done using One way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison tests and Student's *t* test; *p<0.05; **p<0.005..... 128
- 3.3 Effect of *G. americana* on differentiation cell signaling pathways.** The cAMP production (A) and phosphorylation state of ERK1/2 (B and D) and p38 MAPK pathways (C and E) were analyzed after 48 h incubation. Quantification of cAMP was performed by enzymatic immunoassay. The phosphorylation of ERK1/2 and p38 and total ERK1/2 and p38 were

- detected by Western blot analysis. Treatment consisted of *G. americana* (Gen) plant extract or plant extract + FKL (50 μ M). Controls consisted of cells treated with DMSO only (CTL) or 50 μ M forskolin (FKL), and specific MAPK inhibitors, PD98059 (PD) (50 μ M) and SB203580 (SB) (10 μ M). Bar graph showing the densitometric analysis and the ratio between phospho-MAPK and total MAPK are performed using ImageJ 1.38x (National Institute of Health, USA). Data represent mean \pm SEM of 3 individual experiments. Statistical analysis were done using One way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison tests and Student's *t* test; **p*<0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.005 (vs CTL)..... 129
- 3.4 Effect of *G. americana* on ERK1/2 phosphorylation.** Erk 1/2 time course activation was determined by Western blot and immunodetection for phospho-Erk 1/2 (p-p44/p-p42: form phosphorylated) and for total Erk 1/2 (p44/p42: independent of phosphorylation state). Cells were submitted to 24 h starvation, 1 h inhibition with PD98059 (A) or *G. americana* (Gen) plant extract at 50 (B), 250 (C) and 500 μ g/mL (D), and stimulation with FBS at different time point (1', 5', 10', 15', 30', 60', and 120'). Western blot analyses were done with cell lysates containing equal amounts of protein (5-10 μ g) (upper panels of blots). Bar graph shows the densitometric analysis and the ratio between phospho-ERK1/2 and total ERK1/2 using ImageJ 1.38x (National Institute of Health, USA). Time '0' represents cells submitted to inhibitor for 1 h but not stimulated with FBS. These figures are representative of at least 3 independent experiments and data are mean \pm SEM..... 130
- 3.5 Effect of *G. americana* on p38 MAPK phosphorylation. p38 α MAPK time course activation was determined by Western blot and immunodetection for phospho-p38 MAPK and for total p38 α MAPK.** Cells were submitted to 24 h starvation, 1 h inhibition with SB203580 (A) or *G. americana* (Gen) plant extract at 50 (B), 250 (C) and 500 μ g/mL (D), and stimulation with FBS at different time point (1', 5', 10', 15', 30', 60', and 120'). Western blot analyses were done with cell lysates containing equal amounts of protein (5-10 μ g) (upper panels of blots). Bar graph shows the densitometric analysis and the ratio between phospho-p38 and total p38 using ImageJ 1.38x (National Institute of Health, USA). Time '0' represents cells submitted to inhibitor for 1 h but not stimulated with FBS. These figures are representative of at least 3 independent experiments and data are mean \pm SEM..... 131
- 4.1 Structures of triterpenes isolated from the leaves of *L. macrophylla*. Lantanolic acid (a), Ursolic acid (b) and Oleanolic acid (c)..... 158**

- 4.2 Cell viability of trophoblast-like cells treated with different doses of ethanolic extract from leaves of *L. macrophylla*.** Cell viability was measured by WST-1 colorimetric assay. BeWo (A) cells were treated with either different concentrations of *L. macrophylla* (LAN 1 to 100 µg/mL) ethanolic plant extract or plant extracts + forskolin (FKL) (50 µM). JEG-3 (B) cells were treated with plant extracts only. Controls consisted of cells treated with DMSO only (CTL) (< 0.5%), FKL (50 µM) and hydroxide peroxide (H₂O₂) (30% solution). Results are expressed in percentage of controls. Statistical analysis were done using One way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison tests and paired t test (n=3)..... 159
- 4.3 Effect of *L. macrophylla* on trophoblast-like cells differentiation.** Biochemical differentiation was verified by measuring the production of the differentiation marker, the human chorionic gonadotrophin (hCG) hormone, in the supernatant and values are expressed in percentage of control (A); Morphological differentiation was measured by counting multi-nucleated cells (syncytia) (B). A syncytium was defined as three or more nuclei (red) in the same cytoplasm without intervening surface desmosomal membrane (green) staining (B; iv and v). The syncytium counting was performed in 5 microscopic fields per well taken randomly and results are expressed as a number of syncytium counted (C). All observations were performed at 20X magnification on monolayer cells. Treatment consisted of *L. macrophylla* (LAN 1-100 µg/mL) plant extract or plant extract + forskolin (FKL) (50 µM). Control consisted of cells treated with DMSO only (CTL) or cells treated with 50 µM FKL, PD98059 (PD) or SB203580 (SB). Data represent mean±SEM of three individual experiments. Statistical analysis were done using One way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test ***p<0.0001..... 160, 161, 162
- 4.4 Effect of *L. macrophylla* on differentiation cell signaling pathways.** The cAMP production (A) and phosphorylation state of ERK1/2 (B and D) and p38 MAPK pathways (C and E) were analyzed. Quantification of cAMP was performed by enzymatic immunoassay. The phosphorylation of ERK1/2 and p38 and total ERK1/2 and p38 were detected by Western blot analysis. Treatment consisted of *L. macrophylla* (LAN 1-100 µg/mL) plant extract or plant extract + FKL (50 µM). Controls consisted of cells treated with DMSO only (CTL) or 50 µM FKL, and specific MAPK inhibitors, PD98059 (PD) (50 µM) and SB203580 (SB) (10 µM). ERK1/2 (B) and p38 (C) phosphorylation state was measure after 48 h treatment. To verify rapid activation of ERK1/2 (D) and p38 (E) cells were starved for 24 h, subjected to different treatments for 1 h and reactivated with FBS for 10 min. Bar graph showing the densitometric analysis and the ratio between phospho-MAPK and total MAPK were performed using ImageJ 1.38x (National

Institute of Health, USA). Data represent mean±SEM of 3-5 individual experiments. Statistical analysis were done using One way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison tests and paired t test; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.005 (vs CTL)..... 163, 164, 167

- 4.5 **Effect of *L. macrophylla* on JEG-3 cell Ca^{2+} uptake.** Cells were pretreated for 24 h with *L. macrophylla* (LAN1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and controls: $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) (0,5 nM and 100 nM), vehicle (ethanol or DMSO), or forskolin (FKL) (50 μM) (A-E). The Ca^{2+} uptake was done at different time points (0 to 20 min) using $^{45}\text{Ca}^{2+}$. The Ca^{2+} uptake were expressed as nmol of Ca^{2+} per mg of cellular proteins. Data represent mean \pm SEM of three individual experiments. Paired t test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,05$; *** $p < 0,005$) was used to analyze each time point..... 166, 167
- 4.6 **Effect of *L. macrophylla* on JEG-3 cell surface membrane controlled Ca^{2+} uptake.** Confluent JEG-3 cells were pretreated for 10 min with *L. macrophylla* (LAN1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), $\text{CoC}_{12}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (CoCl_2) (200 μM), or ruthenium red (RuR) (10 μM) (F) and analysed for Ca^{2+} influx at 0 (zero), 30 sec, and 1 min using $^{45}\text{Ca}^{2+}$. The Ca^{2+} uptake were expressed as nmol of Ca^{2+} per mg of cellular proteins. Data represent mean \pm SEM of three individual experiments. Paired t test (* $p < 0,05$) was used to analyze each time point..... 168
- 4.7 **Effect of *L. macrophylla* treatment on Ca^{2+} transport proteins.** After 24 h of treatment, the Ca^{2+} transport proteins PMCA1/4, TRPV-6, TCTP, and CaBP28 expression was measured in JEG-3 cells by Western blot. Results were expressed as a ratio of control cells which consisted of cells treated with DMSO only (CTL), forskolin (FKL) (50 μM) or $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) (100 nM). Data from five different experiments were compared and analyzed with paired t test (** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$)..... 169
- 4.8 **Effect of *L. macrophylla* treatment on Ca^{2+} transport proteins mRNA expression.** Total RNA was extracted from confluent JEG-3 cells after 24 h treatment with *L. macrophylla* (LAN1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) (100 nM). mRNA expression of PMCA1, PMCA4, TRPV-6, and TCTP, was measured using semi quantitative Real-time PCR. Control (CTL) consisted of cells treated with vehicle (DMSO). Results are expressed by the normalized ratio of each sample using ribosomal gene 18S as reference. Data represent mean \pm SEM from three different treatments. Paired t test (* $p < 0,05$)..... 170

5.1	<p>Schéma général de l'effet de Millepertuis (SJW), hypericine (HYP) et <i>Lantana macrophyla</i> (LAN) sur le transport du Ca^{2+} par les cellules JEG-3. ↑: augmentation de l'expression; ↓: diminution de l'expression; sphères rouges: Ca^{2+}; sphères bleues: Na^{2+}; AMPc, adenosine monophosphate cyclique; ATP, adenosine triphosphate; CaBP, <i>calcium-binding proteins</i>; CT, récepteur de calcitonine; GTP: guanosine triphosphate; IP3, <i>inositol-1,4,5-triphosphate</i>; N: noyaux; NCX: <i>sodium-calcium exchanger</i>; PKA, <i>protein kinase A</i>; PLC, <i>phospholipase C</i>; PTH1R, <i>parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor</i>; PTHrP <i>mid-molecule, putative receptor that binds the mid-molecular fragment of PTHrP</i>; RE: reticulum endoplasmique; TRPV, <i>transient receptor potential, vanilloid family</i>.....</p>	177
-----	---	-----

LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page
1.1	Exemples de plantes médicinales utilisées pendant la grossesse ou durant la période précédant immédiatement la grossesse, avec leur usage dans la médecine traditionnelle et l'action cellulaire et/ou clinique de leur efficacité.....	66
1.2	Exemples de mécanismes d'action d'extraits des plantes médicinales dans les systèmes cellulaires des mammifères.....	70
1.3	Exemples de mécanismes d'action des métabolites isolés à partir de plantes médicinales dans les systèmes cellulaires des mammifères.....	71
2.1	Effect of ruthenium red on JEG-3 cells Ca^{2+} uptake. To verify the dose-response of Ca^{2+} uptake, cells were treated with increasing concentration of ruthenium red (1 to 1000 μM) for 10 minutes and uptakes were performed in HBSS for 1, 5 and 15 minutes. Control consisted of HBSS treated cells. Results are expressed as nmol of Ca^{2+} /mg of protein.....	95

LISTE DES ABRÉVIATIONS

µg : microgramme

µM : micromolaire

[Ca²⁺]_i: «intracellular Ca²⁺ concentration»; concentration intracellulaire du Ca²⁺

1,25-(OH)₂D₃: vitamine D₃

AKAP: «A kinase anchoring proteins»; protéines d'ancrage spécifique de kinase A

AMPc: adénosine monophosphate cyclique

ARNm: acide ribonucléique messenger

Asp: asparagine

ATCC: *American tissue culture collection*

ATF1: «activating transcription factor 1»; activating transcription factor 1*

ATP: adénosine triphosphate

BBM: «brush border membrane»; membrane de bordure en brosse

BMK : «Big MAPK kinase»; protéine kinase de protéine kinase activée par des mitogènes Big

BPM: «basal plasma membrane»; membrane basale plasmatique

BSA: «bovine serum albumin»; albumine sérique bovine

BSPRY: «B-box SPRY-domain-containing protein»; protéine contenant le domaine B-box SPRY

-C, COOH: terminaison carboxyle

Ca²⁺: ion calcium

Ca²⁺_i: Ca²⁺ intracellulaire

CaBP: «calcium binding protein»; protéine liant le calcium

CaBP28k: «calcium binding protein 28k»; protéine liant le calcium 28k

CaBP9k: «calcium binding protein 9k»; protéine liant le calcium 9k

CaM: calmoduline

CaN: calcineurine

* Les noms conservés en langue anglaise l'ont été parce qu'aucun équivalent français n'a été trouvé dans l'ensemble de la littérature consultée.

CCR5: «C-C chemokine receptor type 5»; récepteur de chimiokine type C-C 5
 CG: cytosine-guanine
 CNG: «cyclic nucleotide-gated»; canaux à portes nucléotidiques cycliques
 CoCl₂: chlorure de cobalt
 CREB: «cAMP response element binding»; élément de réponse liant l'AMPc
 CRF: «corticotropin-releasing factor»; facteur de libération de la corticotrophine
 CRIB: «Cdc42/Rac interactive binding»; domaine de liaison interactive à Cdc42/Rac
 CSF-1: «colony stimulating factor 1»; facteur 1 stimulant la croissance des colonies
 CT: cytotrophoblaste
 CTL: «control»; contrôle
 CYP3A4: cytochrome P₄₅₀ 3A4
 DAG-PKC: «inositol phosphate-diacylglycerol-proteine kinase C»; diacylglycérol et protéine kinase C
 DLK: «dual leucine zipper-bearing kinase»; dual leucine zipper-bearing kinase*
 DMSO: «dimethyl sulfoxide»; diméthylsulfoxyde
 DUSP/MKP: «dual specificity phosphatase/mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatases»; phosphatase à double spécificité/phosphatase de protéine kinase activée par des mitogènes
 ECL: «enhanced chemiluminescence»; chimiluminescence améliorée
 EDTA: «ethylenediamine tetraacetic acid»; acide éthylène diamine tétra acétique
 EGF: «epidermal growth factor»; facteur de croissance épidermal
 EGTA: «ethylene glycol tetraacetic acid»; acide éthylène glycol tétra acétique
 EIA: «enzyme immunoassay»
 eNOS: «endothelial nitric oxide synthase»; synthase endothéliale de l'oxyde nitrique
 ERK: «extracellular signal-regulated kinase»; protéine kinase régulant les signaux extra-cellulaires
 FBP_α: fructose-1, 6-bisphosphate alpha
 FCS: «fetal calf serum»; sérum de veau foetal
 FGF : «fibroblast growth factor»; facteur de croissance du fibroblaste
 FKL: «forskolin α-(methylamino) isobutyric acid»; forskoline
 GAPDH: «glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase»; glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase.
 GDP: «guanosine diphosphate»; guanosine diphosphate
 GEF: «guanine nucleotide exchanger factor»; facteurs d'échange de nucléotide guanine

* Les noms conservés en langue anglaise l'ont été parce qu'aucun équivalent français n'a été trouvé dans l'ensemble de la littérature consultée.

GEN: *Genipa americana*
 GMPC: «cyclic guanosine monophosphate»; guanosine monophosphate cyclique
 GPCR: «G protein-coupled receptor»; récepteurs couplés à la protéine G
 GTP: guanosine triphosphate
 H₂O₂: peroxyde d'hydrogène
 HBSS: «Hank's balanced salt solution»; solution saline de Hank
 hCG: «human chorionic gonadotropin»; gonadotropine chorionique humaine
 hPL: «human placental lactogen»; lactogène placentaire humaine
 HRP: «horseradish peroxidase»; peroxydase de raifort
 HSP27: «heat-shock proteins 27»; protéines de choc thermique 27
 HVA: «high voltage-activated»; courant calcique activé par de hautes tensions
 IGF: «insuline-like growth factor»; facteur de croissance apparenté à l'insuline
 IL : interleukine
 IgG: immunoglobuline G
 iNOS: «inducible nitric oxide synthase»; synthase de l'oxyde nitrique inductible
 IP3: «inositol phosphate 3»; phosphatidylinositol 3
 IPP: «isopentenyl diphosphate», isoprène
 IV: infra violet
 LAN: *Lantana macrophylla*
 LIF : «leukemia inhibitory factor»; facteur inhibiteur de la leucémie
 LPS : lipopolysaccharide
 LSP1: «lymphocyte-specific protein 1»; protéine spécifique leucocyte 1
 LVA: «low voltage-activated»; courant calcique activé par de basse tension
 MAP2: «microtubule-associated protein 2»; protéines associées aux microtubules 2
 MAPK: «mitogen-activated protein kinase»; protéine kinase activée par des mitogènes
 MAPKK: «mitogen-activated protein kinase kinase»; protéine kinase de protéine kinase activée par des mitogènes
 MAPKKK: «mitogen-activated protein kinase kinase kinase»; protéine kinase de protéine kinase de protéine kinase activée par des mitogènes
 MCL1: «myeloid cell leukemia protein»; protéine leucémie myéloïde 1
 M-CSF: «macrophage colony stimulating factor»; facteur stimulant la croissance des colonies de macrophages

MEK : «extracellular signal-regulated kinase (ERK) kinase»; protéine kinase de kinase régulant les signaux extra-cellulaires

MKK: «mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase»; protéine kinase de protéine kinase activée par des mitogènes

MEM: «modified Eagle medium»; milieu de Eagle modifié

MKP: «MAP kinase phosphatase»; phosphatase de MAP kinase

MLK-3: «mixed lineage kinase-3»; mixed lineage kinase-3*

mM: millimolaire

MMP: métalloprotéinases

MNK: «MAPK-interacting kinases»; protéine kinase d'interaction mitogen-activated protein kinase

MSK: «mitogen- and stress-activated kinases»; protéine kinase activée par des agents mitogènes ou de stress

MST: «mammalian Ste20-like kinase»; protéine kinase apparentée à Ste20 des mammifères

MTK 1: «MAP three kinase 1» *

mTOR: «mammalian target of rapamycin»; mammalian target of rapamycin *

MTT: «3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide»; bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium)

MUK: «MAPK upstream kinase»; MAPK upstream kinase *

-N, NH₂: terminaison amine

Na⁺: ion sodium

NCX: «Na⁺/Ca²⁺ exchanger»; échangeur sodium/calcium

NFAT: «nuclear factor of activated T cells»; facteur nucléaire des lymphocytes T activés

NGF: «nerve growth factor»; facteur de croissance des nerfs

NMR: «nuclear magnetic resonance»; résonance magnétique nucléaire

PAK: «p21-activated kinases»; kinase activée par la protéine p21

PBS: «phosphate buffer saline»; tampon phosphate saline

PCR: «polymerase chain reaction»; réaction en chaîne par polymérase

PDE: phosphodiesterases

PDGF: «platelet-derived growth factor»; facteur de croissance dérivé des plaquettes

* Les noms conservés en langue anglaise l'ont été parce qu'aucun équivalent français n'a été trouvé dans l'ensemble de la littérature consultée.

PGH: «placental growth hormone»; hormone de croissance placentaire
 PGI₂: prostaglandine I₂
 PI3K: phosphoinositide 3-kinase
 PKA: protéine kinase A
 PKC: protéine kinase C
 PKR: «dsRNA-activated protein kinase»; protéines kinase activée par l'ARN bicaténaire
 PLC γ : phospholipase C gamma
 PMCA: «plasma membrane calcium ATPase»; pompe à calcium de la membrane plasmique
 PPAR: «peroxisome proliferator-activated receptors»; récepteurs activés par les proliférateurs des peroxysomes
 PRAK: «p38-activated/regulated protein kinase»; protéine kinase régulée/activée par p38
 PTB: «phosphotyrosine binding domain»; domaine de liaison de la phosphotyrosine
 PTH: parathormone
 PTHrP: «parathyroid hormone related protein»; peptide apparenté à la parathormone
 RE: réticulum endoplasmique
 RIPA: «radio immunoprecipitation assay»; radio-immunoprecipitation-essai
 RR: «ruthenium red»; ruthénium rouge
 RSK: «p90 ribosomal S6 kinases»; p90 ribosomal S6 kinases*
 RTK: récepteur de tyrosine kinase
 SAPK/JNK: «stress-activated protein kinase/Jun-amino-terminal kinase»; protéine kinase activé par le stress/ protéines kinase Jun-amino-terminal
 SDS-PAGE: électrophorèse en gel de polyacrylamide avec dodécylsulfate de sodium
 SEM: «standard error of the mean»; erreur standard de la moyenne
 SFK: «Src family of kinases»; kinases de la famille Src
 SH2: «Src homology 2»; Src homology 2*
 SJW: «St. John's Wort»; Millipertuis
 SOC: «store operated channels»; store operated channels*
 SPF: «serum response factor»; facteur de réponse au sérum
 ST: syncytiotrophoblaste

* Les noms conservés en langue anglaise l'ont été parce qu'aucun équivalent français n'a été trouvé dans l'ensemble de la littérature consultée.

STAT3: «signal transducer and activator of transcription 3»; transducteurs de signal et activateurs de transcription 3

SXR: «steroid X receptor»; steroid X receptor*

TBST: «tris-buffered saline tween-20»; tampon salin à base de tris contenant du tween-20

TCTP: «translationally controlled tumor protein»; protéine tumorale régulée par traduction

TNF: «tumor necrose factor»; facteur de nécrose tumorale

TOP: «terminal oligopyrimidine tract»; terminal oligopyrimidine tract*

TRP: «transient receptor potential»; canaux transitoires à potentiel

TRPC: «transient receptor potential canonical ou classical»; récepteur transitoires de potentiels de type classique

TRPM: «transient receptor potential melastatin»; récepteur transitoires de potentiels de type melastanine

TRPV: «transient receptor potential vanilloïd»; récepteur transitoires à potentiel vanilloïdes

UV: ultraviolet

VDAC: «voltage dependent anion channels»; canaux anioniques voltage-dépendants

VEGF: «vascular endothelial growth factor»; facteur de croissance endothélial vasculaire

WHO/OMS: «World Health Organization»; Organisation Mondiale de la Santé

ZPK: «zipper protein kinase»; zipper protein kinase*

* Les noms conservés en langue anglaise l'ont été parce qu'aucun équivalent français n'a été trouvé dans l'ensemble de la littérature consultée.

RESUMÉ

Les plantes médicinales sont une importante source thérapeutique partout dans le monde. Leur consommation repose pour une bonne part sur la croyance populaire voulant que les produits qui en sont dérivés puissent être consommés en toute sécurité. Cependant, les études portant sur les propriétés phytochimiques ou biologiques de plusieurs produits végétaux ont démontré l'action et le potentiel toxique de ces produits sur les systèmes cellulaires des mammifères. Par ailleurs, la consommation de métabolites végétaux pendant la grossesse est peu étudiée et on ne connaît pas l'action de ces produits sur le processus de placentation. Le placenta humain est à la fois un organe multifonctionnel indispensable au développement embryonnaire et une barrière non sélective au passage des substances entre la mère et le fœtus. Le processus de placentation humaine mène à la formation d'un type de placenta où le sang maternel n'entre pas en contact direct avec le sang fœtal et le transfert de nutriment est fait à travers les cellules nommées syncytiotrophoblastes. En plus de produire les hormones qui assurent le maintien de la grossesse, ces cellules constituent un important site pour la régulation de l'homéostasie calcique fœtale dans laquelle sont impliqués plusieurs mécanismes de transfert. En nous basant sur les rapports de littérature scientifique faisant état des interactions entre les composants présents dans certains végétaux et les structures cellulaires chez les mammifères, nous avons émis l'hypothèse que les produits d'origine végétale peuvent affecter la différenciation cellulaire et le transport du Ca^{2+} par les cellules trophoblastiques. Ainsi, la présente thèse a pour but de caractériser l'effet de plantes médicinales sur la différenciation et sur le transport de Ca^{2+} par ces cellules *in vitro*. Pour la réalisation des tests biologiques, nous avons utilisé comme modèle *in vitro* les cellules de lignée JEG-3 et BeWo. Pour cette étude, les extraits bruts de trois plantes médicinales ont été choisis en fonction des critères taxonomique et éthopharmacologique; il s'agit de *Hypericum perforatum*, *Genipa americana* et *Lantana macrophylla*. Nous avons aussi observé l'effet de l'hypericine, une antraquinone isolée de *Hypericum perforatum* qui sert à standardiser l'extrait brut commercial. La caractérisation de l'effet de ces plantes sur la différenciation et le transport du Ca^{2+} a été réalisée à travers le dosage de l'hormone hCG, la fusion cellulaire, l'activation des voies de signalisation impliquées dans la différenciation cellulaire, l'influx de Ca^{2+} et la régulation génomique à travers l'expression des protéines de liaison et de transport du Ca^{2+} . Aussi, nous avons réalisé la caractérisation chimique de *Genipa americana* et *Lantana macrophylla*. De façon générale, les trois plantes étudiées ont affecté le système cellulaire des trophoblastes *in vitro*. Les résultats obtenus de l'étude de *Hypericum perforatum* et hypericine ont démontré que, de manière différenciée, ces deux produits peuvent affecter l'influx de Ca^{2+} intracellulaire des cellules JEG-3 à travers la régulation de l'expression des protéines du transport du Ca^{2+} . Les résultats de l'effet de *Genipa americana* sur les cellules BeWo ont démontré que l'extrait éthanolique de cette plante peut affecter la viabilité/prolifération cellulaire et interférer dans la voie de signalisation de MAPK; la

présence unique de stéroïdes dans l'extrait éthanolique des fruits de *Genipa americana* indique probablement une action de ces métabolites sur les voies de MAPK. L'étude de l'effet de l'extrait éthanolique des feuilles de *Lantana macrophylla* sur l'influx du Ca^{2+} de cellules JEG-3 a indiqué une importante action de cet extrait sur l'homéostasie calcique caractérisée par l'augmentation de la concentration interne de Ca^{2+} et aussi par l'augmentation de l'expression des protéines liant le calcium; par ailleurs, l'activation des voies des MAPK à court et long terme ainsi que la diminution significative de l'hormone hCG ont démontré son interférence sur la différenciation des cellules BeWo. De plus, la caractérisation chimique de l'extrait de *Lantana macrophylla* a révélé la présence de trois triterpènes: les acides oléanolique, ursolinique et lantanolique, ce qui indique l'implication de ces substances dans l'homéostasie et la différenciation des cellules trophoblastiques. En conclusion, nous avons pu démontrer, avec l'utilisation des modèles *in vitro* JEG-3 et BeWo, l'effet toxique distinctif de certaines plantes médicinales sur la formation et la fonction du placenta. L'ensemble des résultats indique que ces produits d'origine végétale peuvent induire des effets défavorables à la formation du placenta et/ou au développement du fœtus pendant la grossesse.

Mots-clés: trophoblastes, plantes médicinales, transport du calcium, différenciation cellulaire.

INTRODUCTION

L'utilisation médicinale de plantes est une des pratiques thérapeutiques les plus anciennes. Des cas attestés il y a 7000 ans en Chine seront suivis par plusieurs autres tout au long de l'histoire. La découverte du Nouveau Monde, en particulier, avec sa grande richesse naturelle, a eu une forte influence tant sur l'alimentation que sur la pharmacopée humaines (Delaveau, 1982). Aujourd'hui, les plantes sont largement utilisées et surtout recommandées par les thérapeutes et les organisations publiques de santé comme l'Organisation mondiale de la santé (OMS/WHO, 2002). De plus, dans les pays comme la France (Legifrance, 2007), le Canada (Canada, 2003) et le Brésil (Marques, 1999; Carvalho et al., 2007), les médicaments à base de plantes bénéficient d'une autorisation de mise en marché qui donne au consommateur des garanties de qualité et d'innocuité.

Malgré la volonté des diverses autorités gouvernementales de réglementer le marché des produits naturels, une bonne partie de tout ce qui concerne la consommation des plantes médicinales échappe à ces réglementations. Très souvent, les plantes sont consommées sans prendre en considération leur toxicité, leur synergisme avec d'autres substances ni même la proposition médicinale originale établie par la médecine traditionnelle (Veiga Junior et Pinto, 2005). Les produits végétaux peuvent aussi présenter un effet adverse si la posologie n'est pas respectée ou s'ils sont ingérés durant une longue période. Par ailleurs, il arrive que tous les ingrédients ne soient pas indiqués ou connus comme il est également possible que la concentration des ingrédients varie d'une marque commerciale à l'autre et même entre les différents lots d'une même marque (Marcus and Snodgrass, 2005).

Des études auprès de groupes de femmes enceintes démontrent que certaines plantes sont souvent utilisées pour traiter une gamme très variée de problèmes médicaux sans une claire évidence de leur efficacité (Damasceno et al., 2002; Tiran, 2003; Rousseaux et Schachter, 2003; Born et Barron, 2005; Refuerzo et al. 2005; Ticktin et Dalle, 2005; Dugoua et al., 2006; de Boer and Lamxay, 2009; Moussally et al., 2009). La consommation des

produits provenant de plantes médicinales pendant la grossesse est surtout motivée par la croyance populaire voulant qu'elles puissent être consommées en toute sécurité. Pendant la grossesse, le placenta est l'organe responsable du développement du fœtus, du maintien de la grossesse et des échanges materno-fœtaux. L'établissement du placenta compte sur la formation d'une couche cellulaire formée par les cellules géantes multinucléées, les syncytiotrophoblastes, qui séparent le sang maternel du sang fœtal; participent à cette formation plusieurs processus cellulaires dont l'activation de diverses voies de signalisation. Ces cellules garantissent la production hormonale, la nutrition et l'excrétion des déchets fœtaux. Elles sont aussi responsables du transfert des substances en mettant en disponibilité les métabolites tels que le glucose, les acides aminés, les acides gras et les minéraux (Battaglia et Meschia, 1988; Smith et al., 1992; Lafond et al. 1994; Lafond et al., 2001; Jansson et Powell, 2006; Haggarty, 2002). Il importe de mentionner que c'est précisément à travers ce système de transfert placentaire que l'homéostasie calcique du fœtus est assurée (Hershberger and Tuan, 1998).

Les substances d'origine végétale sont des produits chimiques et, de ce fait, ont le même potentiel que les médicaments industriels à causer des effets secondaires nuisibles au développement du fœtus (Marcus et Snodgrass, 2005). Des études utilisant les modèles animaux ont déjà démontré dans ce sens le potentiel tératogène de certaines plantes médicinales (Mello et al., 2005; Schwarz et al., 2005; Goel et al., 2006). Cependant – et cela s'explique tant par des questions d'éthique que de viabilité des techniques – on constate que les études portant sur les effets de plantes médicinales au cours de la grossesse et sur le développement du fœtus humain sont tout simplement inexistantes.

De ce qui précède, découlent quelques questions qui ont donné son orientation initiale à notre recherche. Est-ce que les plantes médicinales peuvent affecter la formation et la fonction du placenta? Les substances provenant de plantes médicinales peuvent-elles interférer dans le processus cellulaire comme les voies de signalisation et l'expression génique et protéique? Les produits végétaux peuvent-ils interagir avec les protéines de surface cellulaire et affecter le transfert des minéraux à travers la cellule? En vue de répondre

à ces questions, nous avons proposé l'identification de l'effet des plantes médicinales pendant la grossesse en utilisant le modèle *in vitro* de lignées cellulaires d'origine trophoblastique.

Parmi les milliers de plantes répertoriées ou non, utilisées à des fins médicinales, nous en avons choisi trois en suivant des critères d'ordre taxonomique (chaque plante provenant d'une famille différente) et ethnopharmacologique (en raison de leur utilisation dans la culture populaire).

La première plante, l'*Hypericum perforatum* (famille Guttiferae), plus connue sous les noms de Millepertuis, St. John's Wort (SJW) ou simplement Hypericum, a été choisie pour sa grande popularité et, malgré une controverse existant à ce sujet, son utilisation pendant la grossesse. De plus, l'interaction entre ses composants et les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR), les transporteurs comme la glycoprotéine P, les canaux d'ion comme les canaux de courant calcique activé par de hautes tensions et l'ADN cellulaire a bien été décrite dans la littérature. Un de ses composants, l'hypericine, est une substance très intéressante à étudier parce que: 1) les rapports de littérature indiquent son influence sur le transport du Ca^{2+} ; 2) nous disposons d'études cliniques avancées à son sujet; et 3) c'est la seule substance employée pour normaliser l'extrait de SJW (Kerb et al., 1996; Butterweck et al., 2002; Gao et Ge, 2005; Gioti et al., 2005; Du et al., 2007; Wurglics et Schubert-Zsilavec, 2006).

La deuxième plante, de la famille Rubiaceae, est la *Genipa americana* (appellation courante: Jenipapo), un arbre fruitier du Brésil et d'Amérique Centrale. Ses fruits sont largement utilisés à des fins industrielles et médicinales. Toutefois, peu d'études montrant la composition chimique ou l'activité biologique de la *G. americana* sont disponibles. Quelques études démontrent la capacité toxique de l'iridoïde isolé des fruits (Yamano et al., 1990).

La troisième plante choisie est *Lantana macrophylla* Schauer (famille Verbenaceae). Il s'agit d'une plante médicinale de la forêt atlantique de l'Amérique du Sud employée dans le traitement des désordres menstruels et respiratoires. À ce jour, aucune donnée n'est disponible sur l'analyse phytochimique de la plante. Quant à l'effet biologique, les études préliminaires réalisées par le laboratoire de Produits Naturels à l'Universidade Estadual de

Santa Cruz ont démontré chez elle une activité antimicrobienne. Cependant, un autre membre de la même espèce, *Lantana camara* est bien connue pour sa toxicité associée à l'empoisonnement des animaux de ferme (Sharma et al., 1988b; Ganai et Jha, 1991) et pour provoquer la tératogénie chez la souris (Mello et al., 2005).

En partant du fait que les études portant sur les propriétés phytochimiques ou biologiques des espèces *Hypericum*, *Genipa* et *Lantana* ont démontré que ces plantes peuvent induire des effets défavorables sur la formation du placenta et/ou sur développement du fœtus pendant la grossesse, notre travail a pour objectif général d'identifier les mécanismes à travers lesquels ces plantes peuvent affecter la différenciation cellulaire et le transport du Ca^{2+} des trophoblastes *in vitro*. Pour y arriver, il conviendra d'identifier de manière spécifique l'effet d'extraits de ces plantes sur: 1) la différenciation biochimique et morphologique du trophoblaste *in vitro* à travers, respectivement, la production de la gonadotrophine chorionique humaine et la fusion cellulaire; 2) l'activation des voies de signalisation impliquées dans la différenciation cellulaire; 3) le transport de Ca^{2+} comme fonction biologique résultante de la différenciation cellulaire; et 4) la régulation de l'expression des protéines de liaison/transport du Ca^{2+} .

Les extraits que nous avons utilisés sont l'extrait commercial de *H. perforatum* acheté dans le marché local et les extraits éthanoliques obtenus des plantes récoltées en collaboration avec le Laboratoire de Produits Naturels à l'Université de Santa Cruz, Brésil. Pour ce qui est de la réalisation des essais biologiques, nous avons eu recours aux cellules de lignées dérivées de choriocarcinome humain, respectivement BeWo et JEG-3.

En plus des trois articles rédigés dans le cadre de ma recherche, la présente thèse comprend une discussion générale sur les articles ainsi qu'une revue de littérature. Les quatre parties de la revue de littérature portent successivement sur la formation et la fonction du syncytiotrophoblaste, la biologie des plantes médicinales, les plantes médicinales et le système cellulaire des mammifères et cellules de lignées comme modèle *in vitro*. La discussion générale porte, en les plaçant dans un contexte plus global, sur les résultats

communs aux trois plantes, l'utilisation des cellules de lignée comme modèle pour le placenta et différents aspects concernant la recherche sur les plantes médicinales.

CHAPITRE 1

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 Le placenta humain

Le placenta humain est un organe multifonctionnel indispensable au développement embryonnaire et représente le contact intime entre le fœtus et la mère. Il exerce un rôle fondamental dans le développement fœtal, permettant le maintien de la grossesse, les échanges materno-fœtaux (gaz, excréments, etc.), la synthèse et sécrétion d'hormones, la production des érythrocytes et le contrôle thermique (Hill et Longo, 1980; Saintonge et Rosso, 1983; Bernischke et Kaufmann, 1995; Van der Aa et al. 1995; Audus et al., 2002).

En outre, cet organe est exposé aux influences de l'environnement intra-utérin et aux nombreuses agressions de nature diverse qui affectent aussi le fœtus (Beebe et al., 1996). Par exemple, les calcifications placentaires augmentées et prématurées sont associées à la consommation de cigarettes ou au traitement à l'héparine et l'aspirine pendant la grossesse (Kanne et al., 2005). On trouve un autre exemple de la sensibilité du placenta dans les problèmes de formation et de fonctionnement du syncytiotrophoblaste (ST) qui sont associés aux maladies génétiques fœtales comme le Syndrome de Down (Pidoux et al., 2007).

Le cytotrophoblaste (CT), une cellule d'origine embryonnaire, constitue l'élément-clé du processus de formation du placenta humain. Au cours du processus de placentation, les mécanismes réglant les diverses activités du CT (telles que la prolifération, la migration, l'invasion, la différenciation par fusion cellulaire et la coopérativité intercellulaire) sont fondamentaux pour le maintien de la grossesse et le développement fœtal (Malassine, 2001).

1.1.1. La formation du placenta

Le processus de placentation humain amène à la formation d'un type de placenta dénommé hémomonochorial. Ce processus est continu pendant toute la gestation pour s'adapter aux besoins métaboliques de l'embryon en croissance (Loke et King, 1995; Morrish et al., 2001).

La cellule essentielle au cours de ce développement placentaire est le CT. Immédiatement après la nidation du blastocyste dans la muqueuse utérine, cette cellule pluri-potentielle peut suivre deux voies de différenciation afin de former le trophoblaste villositaire et extravillositaire (figure 1.1). Le trophoblaste villositaire recouvre la villosité chorionale et est impliqué dans le transfert de nutriments et les échanges gazeux entre la mère et le fœtus. Le trophoblaste extra-villositaire pénètre profondément dans la muqueuse utérine jusqu'au myomètre et interagit avec les nombreuses cellules maternelles constituant ou infiltrant le tissu utérin (Evain-Brion, 2001).

Pendant la formation du ST, les cellules souches cytotrophoblastiques fusionnent et se différencient. Cette différenciation est aussi bien morphologique que biochimique (Kliman et al., 1986; Malassine et Cronier, 2002). Elle se caractérise par la fusion des CT mononucléaires pour former des cellules géantes polynucléaires, par l'activation de certains gènes exprimés spécifiquement dans le ST (Morrish et al., 1998; Castellucci et al., 2000; Cross, 2000; Knöfler et al., 2001) et par l'activation des plusieurs protéines kinases (Daoud et al., 2005; 2006; 2008). De plus, dans ce processus de différenciation, un mécanisme de fusion est induit par l'expression des protéines d'enveloppe des rétrovirus endogènes humains (HERVs), comme syncytin/ERVWE1 et syncytin-2 (Huppertz et al., 2006; Malassine et al., 2007; Kudaka et al., 2008; Vargas et al., 2009).

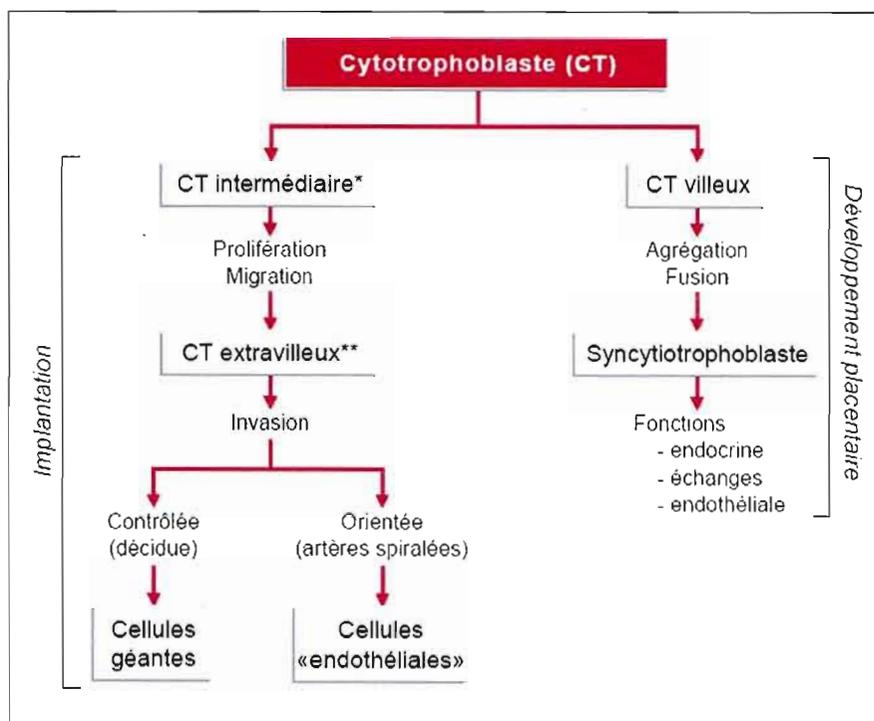


Figure 1.1 Principales voies de différenciation du cytotrophoblaste (CT).
(Tirée de Alsat et al., 1999.)

Ainsi, le placenta hémomonochorial est constitué de plusieurs couches juxtaposées qui forment une barrière empêchant le sang maternel d'entrer en contact avec le sang fœtal et qui constituent l'unité structurale et fonctionnelle du placenta, la villosité chorionique. Ces couches sont formées par les trophoblastes CT et ST, l'endothélium des capillaires placentaires et le mésenchyme qui entoure ce dernier (Leiser et Kaufmann, 1994; Malassine, 2001; Evain-Brion, 2001) (figure 1.2).

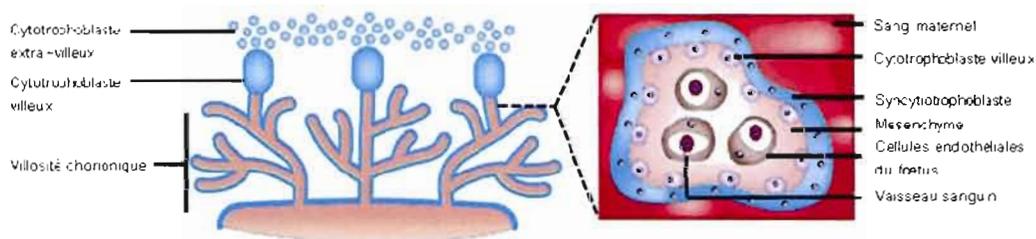


Figure 1.2 Les villosités chorioniques et les couches qui forment la barrière placentaire. La barrière placentaire est initialement composée de 4 couches: l'endothélium vasculaire fœtal, le tissu conjonctif ou mésenchyme, le cytotrophoblaste et le syncytium. (Adaptée de Rossant et Cross, 2001.)

1.1.1.1 Régulation de la différenciation du trophoblaste

La différenciation du trophoblaste villositaire et extravillous est régulée par des facteurs stimulateurs ou inhibiteurs (Chakraborty et al., 2002; Li et al., 2005) (figure 1.3). D'ailleurs, *in vitro*, la différenciation des trophoblastes villositaires peut être induite par les facteurs de croissance épidermique (EGF, *epidermal growth factor*), facteur inhibiteur de la leucémie (LIF, *leukemia inhibitory factor*), facteur 1 stimulant la croissance des colonies (CSF-1, *colony-stimulating factor 1*), CSF de granulocyte/macrophage (GM-CSF), facteur de croissance apparenté à l'insuline (IGF, *insulin-like Growth Factor*) I et II et l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) (Keryer et al., 1998; Knofler et al., 2001; Constância et al., 2002; Malassine et Cronier, 2002; Handwerger et Aronow, 2003; Forbes et al., 2008).

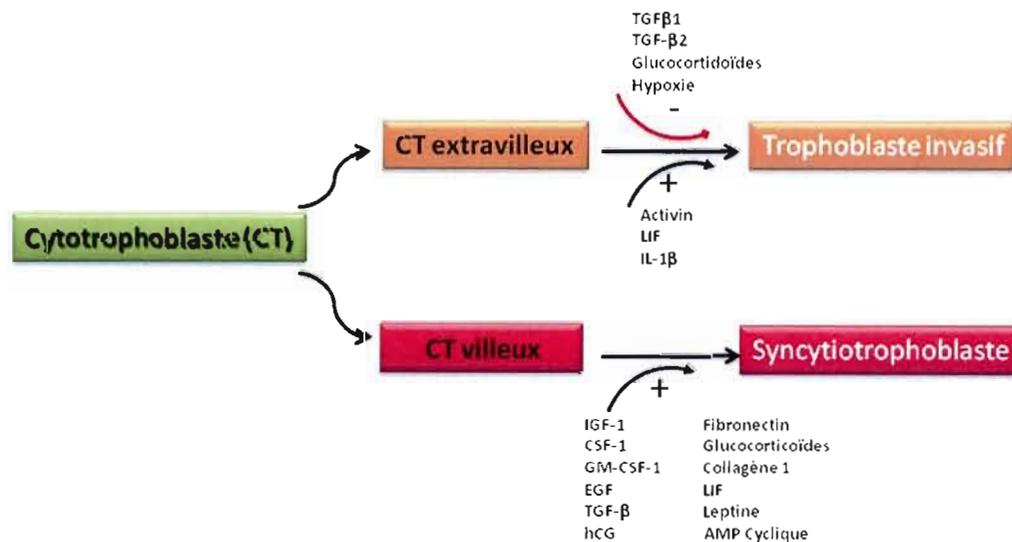


Figure 1.3 Exemples de facteurs de régulation de la différenciation du trophoblaste. Le signe « + » (plus) indique une stimulation et le signe « - » (moins) indique une inhibition. AMP, adenosine monophosphate; IGF-1, *insulin-like growth facteur-1*; CSF-1, *colony-stimulating factor-1*; GM, *granulocyte/macrophage*; EGF, *epidermal growth factor*; TGF β , *transforming growth factor beta*; hCG, *chorionic gonadotrophin*; LIF, *leukemia inhibitory factor*; IL, *interleukine*. (Adaptée de Handwerger et Aronow, 2003.)

Concomitamment à la régulation par plusieurs facteurs cellulaires, il y a la programmation génique qui contrôle la détermination du lignage de trophoblaste ainsi que la différenciation de CT en ST. Handwerger et Aronow (2003) ont démontré que l'expression génique pendant la différenciation du CT en ST est accompagnée d'une programmation génique fortement dynamique requérant l'activation et la répression d'un nombre substantiel de gènes au détriment d'une voie fonctionnelle pour le précurseur et pour les produits cellulaires finaux. Par exemple, après la formation du syncytium, il y a une importante induction des gènes codant pour les hormones polypeptidiques impliquées dans la communication intercellulaire comme la gonadotrophine chorionique humaine (*human chorionic gonadotropin*, hCG), l'hormone placentaire lactogène (*human placental lactogen*, hPL), l'hormone de croissance placentaire (*placental growth hormone*, PGH) et la progestérone (Evain-Brion, 2001; Lacroix et al., 2002a,b).

En somme, la régulation de la différenciation du CT en réponse aux facteurs de régulation comporte trois points principaux: l'acquisition des caractéristiques antigéniques, la production hormonale et la transformation morphologique caractérisée par la formation des groupes de cellules polynucléaires. Ces trois aspects sont très importants pour démontrer la maturation phénotypique des trophoblastes. Au niveau de la formation du ST *in vitro* et *in vivo*, la production hormonale peut être dissociée de la différenciation morphologique (Morrish et al., 1998; Daoud et al., 2008). La production hormonale peut représenter simplement un effet sécrétoire de ces cellules en réponse à différents stimuli et non un effet résultant de la différenciation cellulaire. La figure 1.4 nous donne une vue d'ensemble de la production dissociée d'hormones trophoblastiques *in vivo* et sa relation avec plusieurs facteurs de stimulation.

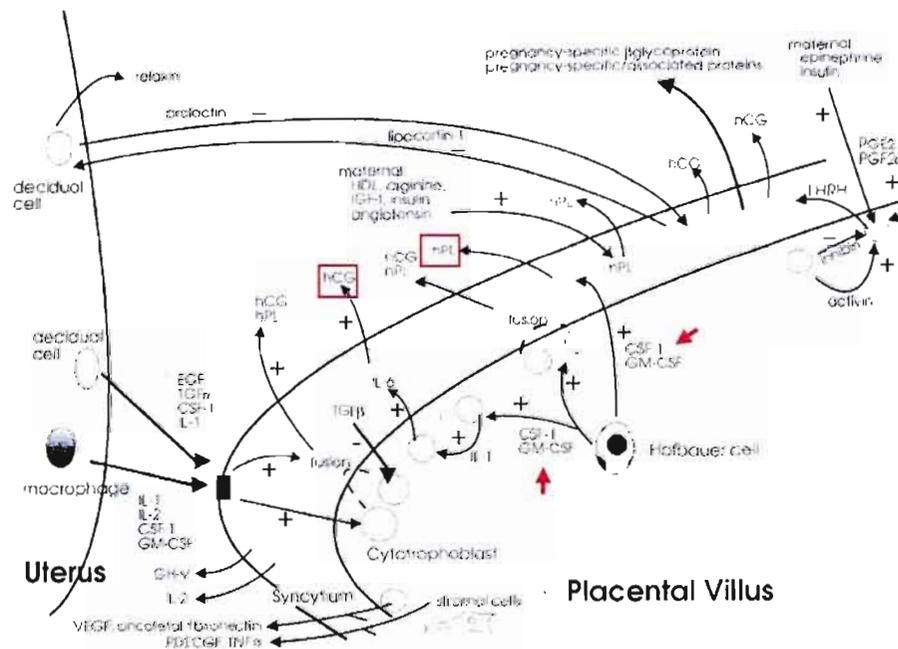


Figure 1.4 Régulation de la différenciation placentaire et sécrétion des hormones hCG et hPL par les facteurs de croissance. Les cytokines comme le facteur 1 stimulant la croissance des colonies (CSF-1, *colony-stimulating factor*) et le CSF de granulocyte/macrophage (GM-CSF) peuvent modifier la sécrétion hormonale (indiqué par les fleches rouge) sans nécessairement moduler la fusion cellulaire. (Tirée de Morrish et al., 1998.)

1.1.1.2. Les voies de signalisation cellulaire et la différenciation du trophoblaste

En plus de la régulation de la différenciation du CT par les facteurs polypeptidiques et la régulation génique antérieurement décrites, les études ont démontré que l'action et l'interaction de multiples voies de signalisation cellulaire jouent un rôle important dans plusieurs aspects du processus de placentation humaine (Daoud et al., 2005; 2006; 2008; Hsu et al., 2008; Moon et al., 2008; LaMarca et al., 2008; Vaillancourt et al., 2009).

Tout d'abord, les protéines kinases activées par des mitogènes (*mitogen activated protein-kinase*, MAPK) - la kinase régulée par le signal extracellulaire 1/2 (*extracellular signal-regulated kinases* - ERK1/2) et la p38 - ont été décrites comme essentielles à l'initiation de la différenciation du CT (Daoud et al., 2005; Johnstone et al., 2005). Une action croisée (*cross-talk*) entre la voie ces deux kinases semble être un important mécanisme compensatoire qui aide à maintenir le processus de différenciation dans son cours normal (Daoud et al., 2005). De plus, une étude récente a démontré que la différenciation biochimique du CT *in vitro* par ces deux MAPK est particulièrement régulée en amont par la protéine tyrosinokinase de la famille de Src (SFK, *Src family kinases*) (Daoud et al., 2008).

Les protéines tyrosines kinases (PTK), représentées par la SFK, jouent un rôle important dans la régulation de la différenciation morphologique et biochimique du CT. Les SFK sont un groupe de PTK dont la réponse dépend d'un grand nombre de différents récepteurs cellulaires (Thomas et Breugge, 1997) incluant les récepteur de PTK, comme l'EGF (Wu et al., 2002). Le groupe des SFK comprend 9 protéines - Src, Fyn, Fgr, Lck, Lyn, Hck, Blk, Yes et Yrk - de poids moléculaires variant entre 52 et 62 KDa et qui présentent 6 régions structurales communes (Brown et Cooper, 1996; Sudol et al., 1993). Leur implication dans les voies de signalisation intracellulaire de différents types cellulaires, dont le trophoblaste, est décrite dans la littérature (Crisanti-Combes et al., 1982; Hecker et al., 1991; Schwartzberg, 1998; Kaabeche et al., 2004). Rebut-Bonneton et collègues (1993) ont décrit le rôle de c-Src dans la différenciation du CT humain tandis que Kamei et collègues (1997) ont démontré que Src, Yes et Lyn étaient activés lors de la différenciation trophoblastique chez le rat. Plus récemment, Daoud et collègues (2006) ont démontré que tous les membres de la famille SFK sont exprimés et activés distinctement pendant la différenciation du CT humain en culture. Ces auteurs suggèrent que l'activation et le profil d'expression distincts de chaque isoforme peuvent déterminer les différents rôles des SFK dans ce processus.

Les kinases de l'adhérence focale (*Focal adhesion kinases*, FAK), un groupe de kinases associées à l'adhérence, la propagation, la migration, la formation et la différenciation cellulaire, est aussi impliqué dans le processus de formation du placenta

(Shiokawa et al., 1998). L'activation des FAK est caractérisée par une cascade de phosphorylation de plusieurs résidus de Tyr libérant un site de liaison pour des protéines contenant un domain SH2 telles que les SFK, qui, à leur tour, seront recrutées et activées (Cornillon et al., 2003). La fonction spécifique des FAK dans la différenciation trophoblastique a été décrite par Daoud et collègues (2008). Ils ont démontré que l'inhibition indirecte de FAK1 via l'inhibition de SFK conduit à une diminution de la différenciation morphologique (adhérence et propagation) du trophoblaste *in vitro*.

1.1.2. La voie des protéines kinases activées par des mitogènes (mitogen-activated protein kinases, MAPK)

La transduction du signal par les MAPK est un des mécanismes les plus fréquents de la régulation cellulaire eucaryote. Toutes les cellules eucaryotes possèdent de multiples voies de MAPK qui sont recrutées par différentes sortes de stimuli extracellulaires afin de générer une réponse cellulaire coordonnée. Les MAPK coordonnent à leur tour la transcription des gènes, la synthèse des protéines et les phénomènes cellulaires comme le cycle, la mort et la différenciation cellulaires (Mordret, 1993; Seger et Krebs, 1995; Ichijo et al., 1997; Sharp et al., 1997; Morooka et Nishida, 1998; Smit et al., 1998; Kyriakis et Avruch, 2001; Li et al., 2001; Asano et al., 2003; Daoud et al., 2005; Johnstone et al., 2005; Moon et al., 2007).

Les voies des MAPK chez les mammifères peuvent être activées par différents stimuli à travers plusieurs familles de récepteurs cellulaires. Pour l'essentiel, ces stimuli sont les hormones et les facteurs de croissance se liant aux récepteurs cellulaires. Les récepteurs qui nous intéressent le plus particulièrement ici sont les récepteurs à activité tyrosine kinases (par exemple, les récepteurs pour insuline, EGF, PDGF - *platelet-derived growth factor*, FGF - *fibroblast growth factor*), les récepteurs des cytokines (ex. hormone de croissance), les récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G hétérotrimériques (Goldsmith et Dhanasekaran, 2007) et les récepteurs à activité sérine/thréonine (Ser-Thr) kinase (ex. TGF- β , *transforming growth factor*) (Inoki et al., 2000; Cordenonsi et al., 2007). Les MAPK sont aussi activées en présence de cytokines de la

famille du facteur de nécrose tumorale (*tumor necrosis factor*, TNF) ou par les facteurs reliés au stress environnemental comme le choc osmotique (Karin, 1998; Kültz et Burg, 1998), la radiation ionisante (Jarvis et Grant, 1999; Kharbanda et al., 1998; Dent et al., 2003) ou le dommage ischémique (Asano et al., 2003; Roth et al., 2003).

Les MAPK sont de petites (38-44 KDa) protéines globulaires compactées. Elles partagent toutes une séquence d'acides aminés qui leur donne, par conséquence, une structure tridimensionnelle similaire (Williams et al., 1993; English et al., 1995; Ui et al., 1998; Goldsmith et al., 2004; Mody et al., 2009). À l'instar d'autres protéines kinases, les MAPK possèdent un domaine catalytique d'environ 270 acides aminés. La subdivision de ce domaine en 12 sous-domaines leur donne la caractéristique de la sous-famille nommée *cdc2/CDC28* (Hanks et Quinn, 1991; Wilson et al., 1997).

Chez les mammifères, les MAPK sont classifiées en 5 sous-familles: les ERK1/2 (*extra-cellular regulated protein kinases*), le JNK (*c-jun N-terminal kinases*), les p38 (Kyriakis et Avruch, 2001), les ERK3/ERK4 et les BMK (*Big MAP kinases* ou ERK5) (Davis, 2000; Chen et al., 2001; Johnson et Lapadat, 2002; Chang et Karin, 2001; Roux et Blenis, 2004).

Pour que la régulation de la voie de MAPK soit efficace, il doit y avoir un rassemblement de trois kinases afin de former un module de signalisation principal (*core signaling module*) et de permettre ainsi une cascade de phosphorylation séquentielle de ces MAPK (figure 1.5). La première kinase de ce module est la MAPK kinase kinase (MKKK). Ces MKKK sont d'abord activées soit par les MKKK kinase (MKKKK), par l'interaction avec des petites protéines de liaison à la protéine G (protéines de la famille Ras ou Rho), par l'oligomérisation ou par la relocalisation cellulaire. Les MKKK sont des kinases sérine/thréonine et, une fois activées, elles phosphorylent et activent la prochaine kinase du module, la MAPK kinase (MKK). Les MKK reconnaissent et phosphorylent le motif conservé *Thr-X-Tyr* (Thréonine-X-Tyrosine) présent dans la boucle d'activation des MAPK, ce qui définit les MKK comme kinase de double spécificité. Les MAPK sont alors les kinases finales du module et, une fois activées, elles iront phosphoryler - doublement elles aussi - les

résidus sérine et thréonine présents dans leurs substrats (Mordret, 1993; Wilson et al., 1997; Widmann et al., 1999; Kyriakis et Avruch, 2001; Pearson et al., 2001).

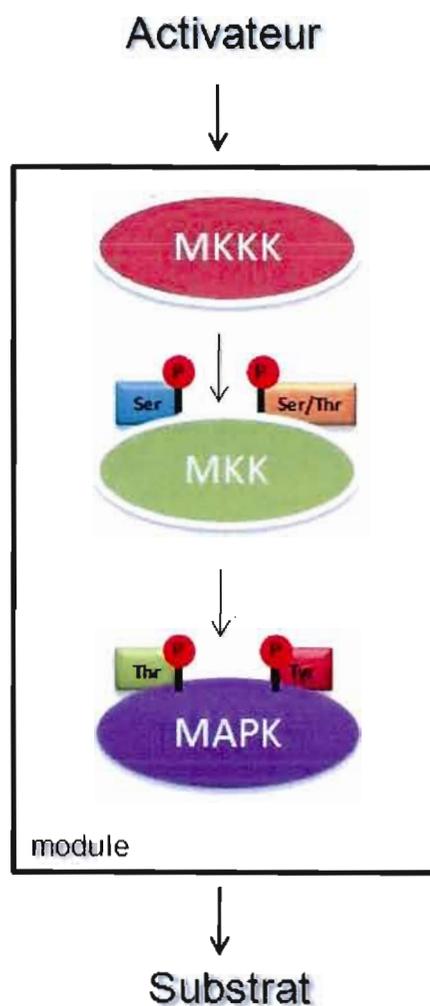


Figure 1.5 Module de signalisation principal de la voie de MAPK. La formation de la voie de MAPK correspond à un module de trois kinases suivant une action séquentielle (Adaptée de Widmann et al. 1999). L'activité des MAPK est contrôlée par la phosphorylation de deux résidus tyrosine – 185 (Y185) et thréonine – 183 (T183) qui sont à la surface de la boucle d'activation.

Les MAPKK sont des kinases de faible spécificité et peuvent mener à la phosphorylation de toutes les kinases en aval du module (Mordret, 1993; Widman et al., 1999). Cependant, les MAPK présentent une importante spécificité de substrat déterminée par la présence de motifs d'interaction aussi bien dans l'enzyme que dans le substrat. En effet, c'est la diversité des domaines régulateurs des différentes MKKK qui donne à la famille des MAPK la flexibilité de la réponse à une large gamme de stimuli cellulaires. En revanche, c'est la spécificité des MAPK qui entraîne une réponse biologique déterminée (Garrington et Johnson, 1999).

En outre, la spécificité et la formation du module d'activation de MAPK sont supportées par la présence des protéines d'échafaudage. Ces protéines ont la propriété de se lier et de séquestrer plusieurs protéines dans un module tout en préservant l'intégrité de ce module et en permettant une activation coordonnée entre les kinases (Whitmarsh et Davis, 1998; Yasuda et al., 1999). Dans certains cas, elles se limitent à la fonction d'échafaudage (par exemple, JIP1, *cJun NH₂ terminal kinase (JNK) interacting protein 1* et JSAP1, *JNK/stress activated protein kinase 1*); dans d'autres, tout en demeurant des protéines d'échafaudage, elles peuvent être des protéines de liaison à fonctions multiples (ex.: JIP3) ou faire partie du module de MAPK (ex.: SEK1, *Stress-activated protein kinases/ERK-kinase 1*) (Ito et al., 1999; Kelkar et al., 2000; Whitmarsh et al., 1998; Yasuda et al., 1999). Subséquemment, les MAPK activées propagent le signal en phosphorylant les cibles en aval que sont les facteurs de transcription, les phospholipases, les protéines du cytosquelette ainsi que les membres de la famille des kinases activées par les MAPK, les MK (*MAPK activated protein kinases*).

Les MK appartiennent à une famille de kinases formée par 11 membres caractérisés par une boucle d'activation (phosphorylation) ciblée par ERK1/2 et p38. Selon l'homologie de leur séquence d'acides aminés, elles sont divisées en cinq sous-groupes: RSK (*p90 ribosomal S6 kinases*), MSK (*mitogen- and stress-activated kinases*), MNK (*MAPK-interacting kinases*), MK2 et -3 et MK5. À leur tour, les MK iront phosphoryler différents substrats et réguler plusieurs réponses biologiques telles que la traduction de l'ARNm, la

prolifération et la survie cellulaires, la réponse nucléaire au stress et la stimulation par les agents mitogènes (Roux et Blenis, 2004).

Ainsi, la stimulation des voies de MAPK a comme résultat final une réponse biologique spécifique. Néanmoins, il est important de prendre en considération que la ou les réponses à un stimulus déterminé n'est pas le résultat de l'activation isolée de la voie de MAPK, mais plutôt le produit de l'intégration de plusieurs changements métaboliques comme, par exemple, l'activation concomitante de différentes voies de MAPK dans la cellule. C'est la somme de ces deux événements (stimulation et intégration) qui détermine le destin de la cellule (Widmann et al., 1999) (figure 1.6).

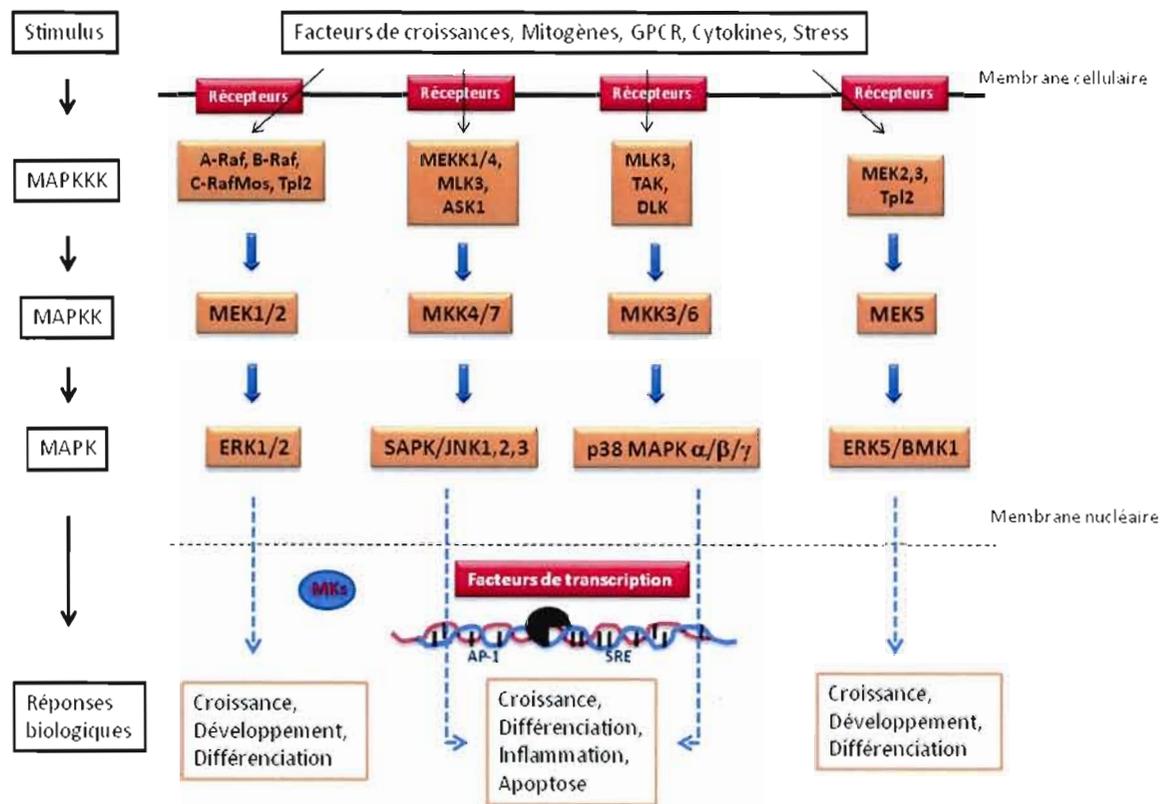


Figure 1.6 Les voies des MAPK. La réponse biologique à un stimulus extracellulaire par la voie de MAPK est achevée par une cascade de signalisation impliquant trois kynases activées en série suite au stimulus. L'activation d'une MAP kinase kinase kinase (MAPKKK) va activer une MAP kinase kinase (MAPKK) qui va, à son tour, activer une MAP kinase (MAPK). La spécificité de la réponse cellulaire est modulée par la sélectivité du substrat comme les facteurs de transcription et les MK (*MAPK activated protein kinases*) et par certaines caractéristiques des événements ultérieurs. (Adaptée de Garrington et Johnson, 1999.)

1.1.2.1. ERK1/2

Parmi le groupe de MAPK dénommé *extracellular signal-regulated kinase* (ERK), la voie de ERK1/2 est la plus étudiée chez les mammifères (Widmann et al., 1999). ERK1 et 2 sont deux molécules ubiquitaires de 43 et 41 KDa, caractérisées par 83% d'homologie (Boulton et al., 1991; Chen et al., 2001). L'analyse de la structure tridimensionnelle de la plus étudiée de ces deux molécules, ERK2, a montré deux formes - non phosphorylée et phosphorylée - qui reflètent son potentiel d'activité (Zhang, 1994; Canagarajah et al., 1997).

À l'instar des autres protéines kinases, ERK2 présente les domaines N-terminal et C-terminal. Le domaine N-terminal contient plusieurs feuillets β avec deux hélices α . Le domaine C-terminal est formé de plusieurs hélices α et de quatre feuillets β qui contiennent plusieurs résidus impliqués dans l'activité catalytique. La libération du substrat ou la fermeture du site actif sont favorisées par un lien flexible entre les deux domaines, lien permettant leur rotation indépendante (Zhang et al, 1994; Canagarajah et al., 1997) (figure 1.7).

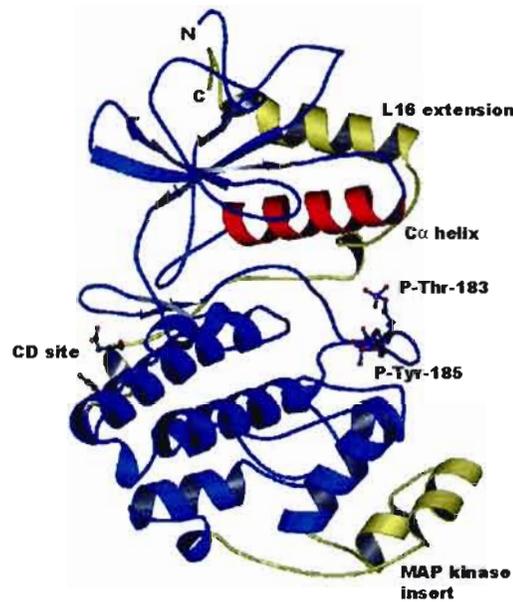


Figure 1.7 Structure tridimensionnelle d'ERK2 (MAPK). P-Thr-183 (threonine 183 phosphorylée) et P-Tyr-185 (thyrosine 185 phosphorylée) représentent respectivement les sites de phosphorylation Y185 et Y183 et se localisent dans la boucle d'activation. Le schéma montre aussi le lieu d'insertion de MAPK (MAP Kinase insert), le domaine CD (*common docking*) et l'extension C-terminal L16. (Tirée de Chen et al., 2001.)

Le module d'activation d'ERK1/2 chez les mammifères est constitué de MAPKKK (A-Raf, B-Raf et Raf-1), de MAPKK (MEK1 et MEK2) et de MAPK (ERK1 et ERK2) (Roux et Blenis, 2004). De façon générale, les récepteurs de tyrosine kinase (RTK) et les GPCR transmettent les signaux d'activation à la cascade Raf/MAK/ERK à travers le cycle GTP/GDP (fonction GTPasique) des différentes formes de Ras (Marshall, 1995; Campbell, et al., 1998).

Ras est un point de convergence entre plusieurs voies de signalisation. Cette protéine est activée transitoirement en réponse à un signal extracellulaire envoyé par les RTK et par les GPCR. Par exemple, la stimulation du récepteur du facteur de croissance épidermale (EGFR, *epidermal growth factor receptor*) par l'EGF mène à une autophosphorylation de résidus tyrosine dans son domaine cytoplasmique. Cette autophosphorylation crée des sites de liaison aux domaines SH2 (*Src homology 2*) et/ou PTB (*phosphotyrosine binding domain*) des protéines adaptatrices Shc et/ou Grb2. Shc, en association avec RTK, passe aussi par une autophosphorylation en créant, à son tour, un site de liaison à Grb2. Tandis que Grb2 est associée stablement à SOS (*son of sevenless*), la translocation du complexe Ras-GEF-SOS (Ras- guanine nucleotide exchanger factor-SOS) modulée par Shc/Grb2 ou Grb2 à la membrane plasmique, où Ras réside, mène à une élévation transitoire des niveaux de Ras-GTP. Ras-GTP est alors capable d'interagir et d'activer plusieurs protéines cytoplasmiques, comme la sérine/thréonine kinase Raf. Conséquent, la protéine Raf activée se lie et phosphoryle les MEK-1 et -2 qui à leur tour phosphorylent ERK1/2 (figure 1.8) (Seger et Krebs, 1995; Campbell et al., 1998; Roux et Blenis, 2004).

Dans les cellules au repos, ERK1/2 est localisée dans le cytoplasme. Cependant, lorsqu'elle est activée, une importante translocation vers le noyau peut être observée. D'ailleurs, il est démontré que la localisation sub-cellulaire d'ERK1/2 joue un rôle important dans la voie de cette MAPK du à l'accessibilité des différents substrats (Chen et al., 1992; Gonzalez et al., 1993; Lenormand et al., 1993). Ainsi, une restriction spatiale de l'activation de ERK1/2 peut contribuer à la spécificité de la réponse au signal cellulaire (Khokhlatchev et al., 1998; Whitehurst et al., 2004).

Lorsqu'elle est activée, ERK1/2 peut induire dans les compartiments cellulaires la phosphorylation de plusieurs substrats comme les protéines membranaires (CD120a, Syk et calnexine), des substrats nucléaires (SRC-1, Pax6, NFAT, Elk-1, MEF2, c-Fos, c-Myc et STAT3), des protéines du cytosquelette (neurofilaments et paxiline) ainsi que plusieurs MK (Chen et al., 2001; Roux et Blenis, 2004).

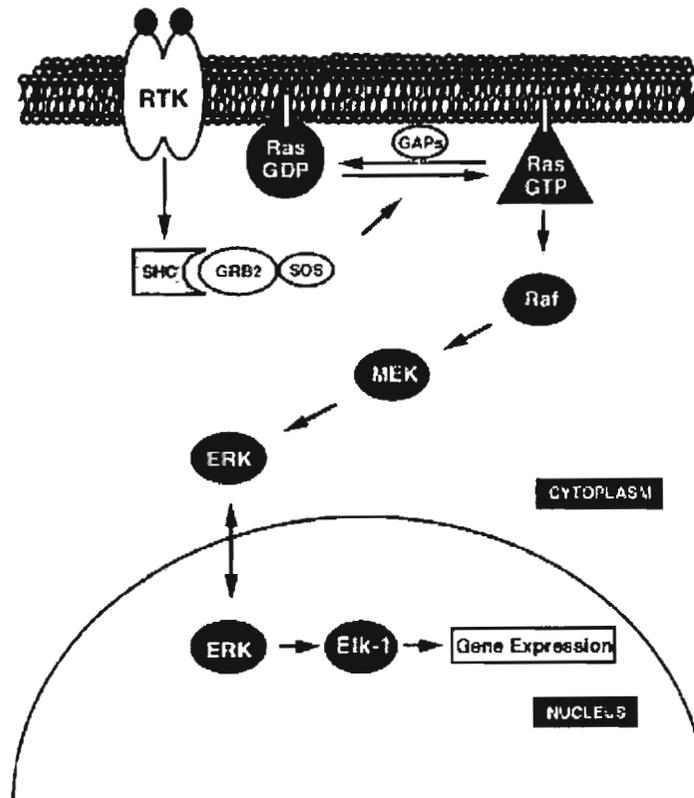


Figure 1.8 Régulation de la cascade d'ERK par Ras. Une voie linéaire, dont Ras module les voies en aval aux récepteurs de tyrosine kinases (RTKs) et les voies en amont constitué du complexe Raf>MEK>MAPK, ce qui constitue un pont entre la surface cellulaire et le noyau. (Tirée de Campbell et al., 1998.)

1.1.2.2. p38

Les premiers indices de l'implication de la p38 α (RK, p40 ou simplement p38) dans la voie de MAPK sont apparus lors de la réponse caractérisée par une phosphorylation au niveau d'une tyrosine suite à la stimulation par l'endotoxine lipopolysaccharide (LPS) (Han et al., 1993). Puis, en ayant recours au clonage et à la caractérisation structurale, la p38 a été

définitivement identifiée comme un membre de la famille de MAPK (Han et al., 1994) ainsi que comme une molécule capable de se lier aux inhibiteurs de la production de cytokines pro-inflammatoires dérivées de pyridinyl imidazoles (Lee et al., 1994). Au même moment, d'autres chercheurs ont identifié la p38 comme une kinase dont l'action était en amont de l'activation de la MK2 dans les cellules stimulées par interleukine 1 (IL-1) (Freshney et al., 1994).

Chez les mammifères, le groupe p38 est constitué par quatre membres ayant 60% d'homologie: p38 α (homonyme p38), - β , - γ (ERK6, SAPK3) et - δ (SAPK4). Ces homologues sont de distribution et d'expression variées: les p38 α et p38 β sont exprimées de façon ubiquitaire tandis que p38 γ et p38 δ sont exprimées dans des tissus spécifiques comme le muscle squelettique, les poumons, les reins, les testicules, le pancréas et le petit intestin (Ono et Han, 2000).

Ainsi que les autres membres de la famille de MAPK, les p38 ont comme caractéristique essentielle de présenter un double site de phosphorylation Thr-X-Tyr (TXY) dans la boucle de régulation entre les domaines VII et VIII. Les p38 ont ceci de particulier que dans leur motif TXY le résidu X est constitué d'une glycine entre les résidus thréonine et tyrosine (TGY), à différence de ERK1/2 qui présente un résidu glutamine (TQY) et de la JNK/SAPK qui présente quant à elle un résidu proline (TPY). C'est justement ce résidu glycine et la longueur de la boucle qui donnent la spécificité de liaison des p38 à leurs substrats (Jiang et al., 1997).

L'expression et l'activation différentielles ainsi que la spécificité du substrat aux p38 constituent un point important de la diversité de la fonction physiologique des p38 dans les différents contextes cellulaires. Par exemple, même si on peut détecter les p38 α et - δ dans les neutrophiles humains, c'est exclusivement la p38 α qui module les événements cellulaires tels que l'adhésion cellulaire, l'activation de NF- κ B et la synthèse de TNF- α induits par LPS (Nick et al., 1999).

L'excellente revue de littérature d'Ono et Han (2000) fait état de nombreux articles qui démontrent la grande variété de stimuli extracellulaires pouvant entraîner l'activation de p38. La p38 peut être activée de trois façons: par stress chimique et physique comme le stress oxydatif (Brewster et al., 1993; Shiozaki et Russell, 1995; Li et al., 2001), par l'hypo-osmolarité (Kumar et al., 1997), par l'irradiation ultraviolette (Hazzalin et al., 1996), par l'hypoxie (Scott et al., 1998); par les interleukines (IL) (Gould et al., 1995, Shalom-Barak et al., 1998, Shapiro et al., 1998) reliés à la réponse immune aux différents pathogènes (Zachos et al., 1999, Beltman et al., 1999); par les facteurs de croissance comme GM-FCS (Foltz et al., 1997), FGF (Tan et al., 1996), NGF (*nerve growth factor*) (Morooka et al., 1998), IGF (Cheng et Feldman 1998), VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (Rousseau et al., 1997) et PDGF (Pyne et Pyne, 1997).

Comme tous les membres de la famille de MAPK, les p38 sont activées par les MKK. Bien que la présence d'un site conservé soit caractéristique de ce groupe de kinases, la spécificité de la liaison de MEK aux différentes formes de p38 est quelque peu singulière. Les deux MEK impliquées dans l'activation de p38 sont MEK3 et MEK6. Même si elles partagent entre elles 80% d'homologie, MEK6 peut activer toutes les p38 alors que MEK3 active seulement p38 α , p38 γ et p38 δ (Dérijard et al., 1995; Keesler et al., 1998; Hu et al., 1999).

La voie de signalisation en amont de MKK/p38 est plutôt diversifiée, ce qui peut expliquer pourquoi la voie de p38 est activée par différents stimuli (Ono et Han, 2000). MEK3 et MEK6 sont phosphorylées par plusieurs MEKK et MLK: MTK1 (*MAP Three kinase 1*), MLK2/MST (*mammalian Ste20-like kinase*) (Takekawa et al., 1997; Hirai et al., 1997), DLK/MUK/ZPK (*Dual leucine zipper-bearing kinase/MAPK upstream kinase/ Zipper Protein Kinase*) (Fan et al., 1996), Ask1/MAPKKKK5 (Ichijo et al., 1997), TAK1 (Moriguchi et al., 1996) et Tpl-2 (Salmeron et al., 1996).

Un autre facteur qui peut contribuer à la régulation et à la flexibilité de la voie de p38 est le motif CRIB (*Cdc42/Rac interactive binding*) de la MEK3. Ce motif est un site de liaison pour les enzymes telles que les kinases sérine/thréonine PAK (*p21-activated kinases*)

et les molécules rassemblées comme Rac et Cdc42, deux membres de la famille Rho de petites GTPases (Zhang et al., 1995; Tibbles et al., 1996; Nagata et al., 1998).

Par ailleurs, les mécanismes de translocation au noyau (Maulik et al., 1998) ou de rétention dans le cytoplasme (Blanco-Aparicio et al., 1999) contribuent aussi à la diversité de la réponse biologique de p38 à une large gamme de stimuli. Cependant, la localisation subcellulaire de p38 après son activation est un sujet qui reste à clarifier.

Finalement, autant que la localisation différentielle de p38 dans la cellule, les différents substrats ciblés par p38 sont des aspects importants de la diversité et de l'amplification du signal cellulaire. Les premiers substrats identifiés pour p38 α ont été les protéines HSP27 (*heat-shock proteins 27*) (Stokoe et al., 1992), mais, tout au long des années, plusieurs autres substrats ont été aussi identifiés: les MAPK3 (Freshney et al., 1994; Rouse et al., 1994; McLaughlin et al., 1996), LSP1 (Huang et al., 1997), CREB (*cAMP response element*) et ATF1 (Tan et al., 1996), les hydroxylases de tyrosine (Thomas et al., 1997), MNK1 (Waskiewicz et al., 1997), MSK (Deak et al., 1998), PRAK (New et al., 1998; Ono et Han, 2000) et SPF (Heidenrich et al., 1999).

1.1.3. Les voies de MAPK et la régulation de la durée du signal – activation soutenue et transitoire

Physiologiquement, l'activation de MAPK est fréquemment transitoire. De ce fait, la déphosphorylation par les phosphatases joue un rôle important, au cours de la stimulation, dans la régulation négative de l'activité des MAPK. Le prototype, la MKP-1 (*MAP kinase phosphatase*), ou CL100/3CCH134, est une phosphatase de kinase caractérisée par une double spécificité pour la T183 et la Y185 (Sun et al., 1993). Chez les mammifères, neuf MKP ont été identifiées et plusieurs d'entre elles sont contrôlées au niveau de la transcription. Ce contrôle de la transcription est ce qui détermine un schéma différencié d'expression de ces enzymes au niveau de la localisation cellulaire, du type de cellule et de tissu (Misra-Press et al., 1995; Martell et al., 1995; Ono et Han, 2000).

Les MKP forment ainsi un mécanisme de régulation négative et différentielle pour les MAPK. La spécificité des substrats des différentes MKP est une autre caractéristique importante dans la régulation de la voie de MAPK. Dépendamment de leur type, les MKP peuvent soit reconnaître et désactiver une classe unique de MAPK, soit désactiver plusieurs voies. Par exemple, la MKP cytoplasmique DUSP6/MKP-3 (*Dual specificity phosphatase 6/mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatases*) désactive seulement ERK1/2, alors que les MKP1, 4 et 5 peuvent causer la déphosphorylation de p38 α et p38 β (Camps et al., 1998; Muda et al., 1996) de la même manière que DUSP1/MKP-1 nucléaire déphosphoryle ERK, JNK et p38 (Owens et Keyse, 2007).

En plus de la localisation subcellulaire, il y a la durée de la stimulation du signal qui peut diriger la fonction biologique de MAPK (Marshall et al., 1995). La durée du stimulus peut entraîner plusieurs phénomènes comme le recrutement des différents complexes protéiques comme Grb2-Sos ou Shc-Grb2-Sos ou encore l'induction de la translocation d'ERK1/2 au noyau (Katz et al., 2007). Plusieurs études ont démontré qu'une activation soutenue de la voie d'ERK1/2 précède la différenciation cellulaire (Mansour et al. 1994, Sharp et al. 1997, Whalen et al., 1997). Par contre, l'activation transitoire de la cascade d'ERK1/2 peut résulter en une prolifération cellulaire des cellules PC12 (Marshall, 1995; Agell et al., 2002).

1.1.4. Les inhibiteurs de MAPK

Afin d'élucider le rôle biologique des différentes voies de signalisation cellulaire, quelques stratégies ont été utilisées. D'abord, les protéines mutantes dominantes négatives qui sont surexprimées dans les cellules ont donné une idée de la fonction spécifique de certaines MAPK (Cowley et al., 1994). Puis, le blocage à travers les inhibiteurs synthétiques a constitué une stratégie largement utilisée pour identifier les substrats physiologiques des enzymes et exploiter la fonction des diverses voies de signalisation cellulaire (Kalmes et al., 1999; Davies et al., 2000). D'ailleurs, un avantage de cette dernière stratégie est que les voies peuvent être étudiées dans tous les systèmes *in vivo* donnant à ces inhibiteurs le potentiel

comme agents thérapeutiques contre le cancer, comme agents anti-inflammatoires ou comme immunosuppresseurs (Alessi et al., 1995).

Les deux dernières décennies ont été marquées par la découverte de plusieurs petits inhibiteurs de protéines kinases caractérisés par leur solubilité à la membrane plasmique et par une action spécifique sur diverses protéines kinases (Lee, 1988; 1989; Cohen et al., 1999; Davies et al., 2000). Voici quelques exemples de ces petits inhibiteurs: la rapamycine, qui inhibe la protéine kinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*, ou FRAP) (Thomas et Hall, 1997); les inhibiteurs SU101 (Shawver et al., 1997) et CGP57148 (Carroll et al., 1997), qui sont des inhibiteurs du récepteur de PDGF; et CP358774 (Moyer et al., 1997), qui inhibent les récepteur de EGF et les inhibiteurs de MAPK U0126 (Duncia et al., 1998), 328006 (Hancock et al. 2005), F180204 (Ohori et al., 2005), RDEA119/BAY 869766 (Iverson et al., 2009) et le deux plus utilisés, PD98059 et SB203580 (Davies, et al., 2000) (figure 1.9).

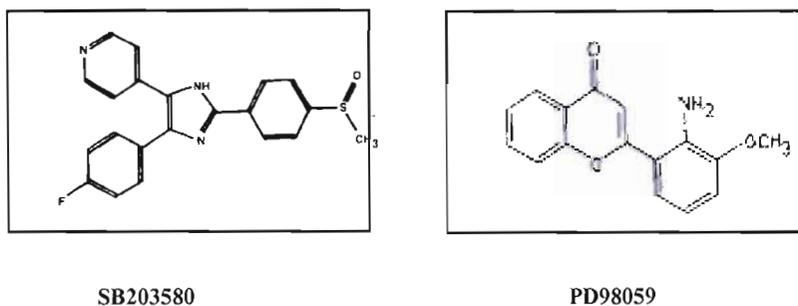


Figure 1.9 Structure d'un inhibiteur de p38 (SB203580) et d'un inhibiteur de la voie de MEK1/2 (PD98059). Tirée de Cuenda et collègues (1995) et Alessi et collègues (1995).

Les pyridinyl imidazoles comme le SB203580 [4-(4'-fluorophenyl)-2-(4'-methylsulfinylphenyl)-5-(4'-pyridyl) imidazole] ont été décrits initialement comme des substances de bas poids moléculaire capables d'inhiber la production du facteur de nécrose tumoral (TNF) et la production de IL-1 suite à la stimulation par le LPS (Lee et al., 1988; 1989; Cuenda et al., 1995). Plus tard, les études ont démontré que l'inhibition de la synthèse de ces cytokines inflammatoires par ces composants pyridinyl résulte de l'inhibition sélective de la kinase p38 (Lee et al., 1999).

De nos jours, alors que plusieurs autres imidazoles se sont ajoutés à la gamme des inhibiteurs de p38 dans la recherche des traitements contre les pathologies inflammatoires, on continue de rechercher de nouveaux inhibiteurs de seconde génération possédant une spécificité pour les isoformes α et β de cette MAPK (Davies et al., 2000; Diller et al., 2005; Kaminska, 2005; Lee et Dominguez, 2005; Montalban et al., 2010).

L'imidazole le plus utilisé pour l'étude de la fonction de p38, le SB203580, est un inhibiteur capable de traverser la membrane plasmique et qui peut agir spécifiquement sur les homologues p38 α et p38 β par compétition avec le site de liaison à l'ATP (Young, et al., 1997). La spécificité de SB203580 était toujours considérée comme la clé de son mécanisme d'action et la littérature confirme l'absence d'effet de cet inhibiteur sur l'activité des ERK, JNK, p38 γ ou p38 δ (Gallagher et al., 1997). Cependant, les études plus approfondies exploitant divers modèles cellulaires et voies de signalisation ont élargi ce concept. Clerk et Sugden (1998) ont prouvé que SB203580 à faible concentration (5-10 μ M) pouvait inhiber certains sous-types de JNK. Kalmes et collègues (1999) ont démontré que cet inhibiteur peut activer, dans les cellules de muscle lisse de babouin, Raf-1 de manière dépendante de Ras et, par conséquent, occasionner la phosphorylation de MEK/ERK. Enfin, Lali et al. (2000) ont démontré que SB203580 peut aussi bloquer la voie de PI3 kinase/PKB (*protéine kinase B*).

L'autre inhibiteur de MAPK largement utilisé, le PD98059 [1-(2'-amino-3'-methoxyphenyl)-oxanaphthalen-4-one], a été un des premiers inhibiteurs synthétiques de la voie des ERK. Cette substance a été découverte initialement grâce au dépistage d'inhibiteur pour la cascade de ERK et identifiée comme un inhibiteur non compétitif de MEK1/2 (Alessi

et al., 1995; Pang et al., 1995). Puis, Dudley et al., (1995) ont démontré que PD98059 inhibait de façon spécifique l'activation de MAPKK par les facteurs de croissance, jouant ainsi un rôle clé dans la prolifération et la différenciation de certains types cellulaires. Finalement, Wartmann et al., en 1997, ont démontré aussi que cet inhibiteur bloquait l'activation de MEK1 par l'inhibition des activateurs en aval de Raf-1.

PD98059 est un flavonoïde qui se lie à la forme inactive de MEK1/2 par le contact entre le carbonyl de l'anneau oxaphnaphthalene-4-1 avec la Met78O de la chaîne principale de l'enzyme et non de façon compétitive en se fixant sur le site de liaison à l'ATP comme les inhibiteurs imidazoles (Dudley et al., 1995; Ohren et al., 2004). La caractéristique de liaison spécifique à MEK1/2, et non aux autres MEK tels que MKK3, SEK (MKK4) ou MKK6 (Touyz et Yao, 2003), fait en sorte que cet inhibiteur est un bon outil pour la recherche de l'implication spécifique d'ERK1/2 dans les différentes fonctions biologiques cellulaires.

1.1.5. La voie de l'AMP cyclique

L'adénosine-3',5'-monophosphate cyclique (AMP cyclique ou AMPc) est un second messenger ubiquitaire formé à partir de la conversion de l'adénosine triphosphate (ATP). L'activation de l'AMPc comprend la liaison d'un ligand extracellulaire avec un GPCR, liaison suivie de l'activation de l'enzyme adényl cyclase (ou adénylate cyclase, AC). Une fois activée, l'AC ira convertir l'AMP en AMPc (Hanoune et al., 1997; Patel et al., 2001).

Il y a au moins dix isoformes d'AC chez les mammifères, dont neuf (AC1 à AC9) associées à la membrane cellulaire et une soluble (AC10), spécifique au sperme et au placenta (Hanoune et al., 1997; Patel, et al., 2001; Smit et Iyengar, 1998; Sunahara et al., 1996; Bernatchez et al., 2003). Toutes les AC présentent différentes propriétés et peuvent être régulées par plusieurs mécanismes.

Les AC membranaires peuvent être activées par les protéines G qui régulent l'entrée du calcium à travers les canaux de Ca^{2+} voltage-dépendant (VDCC) (Zamponi et Snutch, 1998) et par l'interaction avec la Ca^{2+} -calmoduline. Les AC liées à la membrane plasmique

ont une activité enzymatique basale qui peut être augmentée ou réduite par les GPCR en réponse à plusieurs facteurs comme les hormones (ex.: activation par le glucagon) ou les toxines (ex.: inhibition par la toxine du choléra) (Taussing et al., 1993; 1994; McAllister et al., 1994; Kozasa et Gilman, 1995; Sunahara et al., 2002;). La liaison des ligands à leurs récepteurs dans les tissus cibles entraîne une dissociation de la protéine G trimérique en deux sous-unités α et $\beta\gamma$ qui vont interagir avec les isoformes spécifiques de l'AC. L'interaction de l'AC avec la sous-unité α de la protéine G_s ($G_s\alpha$) augmente son activité, tandis que l'interaction de l'AC avec la sous-unité α de la protéine G_i ($G_i\alpha$) cause une diminution de son activité (Tasken et Aandahl, 2004).

Ainsi que le démontre bien la revue de littérature réalisée par Sunahara et Taussing (2002), il existe une grande multiplicité de facteurs qui peuvent réguler les différentes isoformes de l'AC. Le schéma qui suit (figure 1.10) donne une description détaillée de ces multiples facteurs.

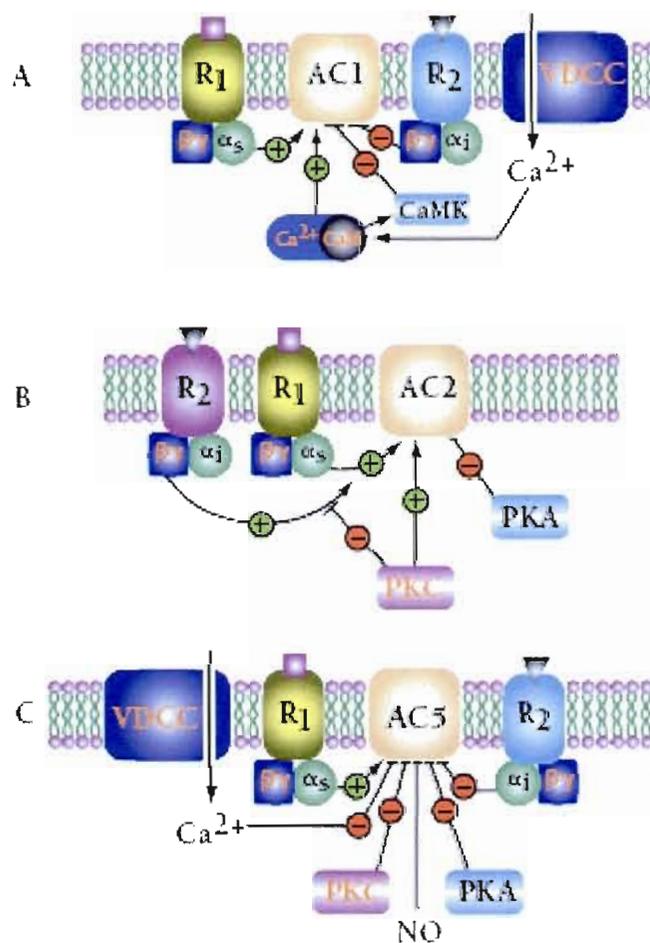


Figure 1.10. La régulation de l'AC est particulière à chaque isoforme. A) Schéma de régulation d'AC1 (également valide pour AC3 et AC8). R1 représente le récepteur de protéine G (ou récepteur β_2 adrénergique) qui se lie à $G\alpha_s$. R2 représente les récepteurs de protéine G (récepteurs muscariniques M-2 et α_1 adrénergique) qui se lie à la protéine $G\alpha_j$. B) Schéma de régulation de l'AC2. La régulation de l'AC2 (également valide pour AC4 et AC7) par $G\beta\gamma$ est dépendante de la coactivation de $G\alpha_s$. PKC peut utiliser AC comme substrat, ce qui entraînera l'élévation de l'activité basale et l'inhibition de la super activation par $G\beta\gamma$. C) Schéma de régulation de l'AC5. Le signal «+» représente une activation et le signal «-» représente une inhibition. PKA – protéine kinase A; PKC – protéine kinase C; CaM – calmoduline; CaMK – calmoduline-dépendante de kinase; NO – *nitric oxide*; VDCC – *voltage-dependent Ca^{2+} channel*). (Tirée de Sunahara et Taussig, 2002)

Une fois que l'AMPc est formée, une de ses fonctions est l'activation de certaines protéines kinases dépendantes de l'AMPc localisées dans le cytosol ou associées à la membrane cellulaire, telle que la protéine kinase A (PKA). Cependant, l'AMPc peut activer aussi d'autres substances effectrices comme les canaux cationiques CNG (*cyclic nucleotide-gated*) et la famille des facteurs d'échange de nucléotide guanine (GEF) impliqués dans la régulation des protéines reliées à Ras (Tasken et Aandahl, 2004).

De toutes les substances effectrices de l'AMPc, les PKA sont les effecteurs les plus fondamentaux. Les PKA font partie de la famille des protéines kinases sérine/thréonine et comprennent deux isoformes: PKA de type I et type II qui comportent deux domaines régulateurs (R) et deux domaines catalytiques (C) (Taylor, 1989). Ces deux domaines possèdent des propriétés physiques et biologiques distinctes; ils sont exprimés différemment et ils sont capables de former différentes holoenzymes de PKA (Skalhegg et al., 1992; Tasken et al., 1997); cet ensemble de différences contribue à la grande versatilité de la voie de signalisation de l'AMPc.

La liaison de deux AMPc au domaine R de la PKA provoque chez cette enzyme un changement structural qui cause à son tour la dissociation de la sous-unité catalytique et qui met en évidence son site actif (Taylor, 1989). La sous-unité catalytique alors activée peut ensuite entraîner la phosphorylation de plusieurs substrats (Builder et al., 1980; Kopperud et al., 2002; Seino et Shibasaki, 2005).

De plus, les phosphodiésterases (PDE) jouent un rôle déterminant dans le nombre des molécules d'AMPc ou de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) intracellulaires qui demeurent inactives. Ces enzymes sont aussi importantes pour l'établissement du gradient de nucléotides cycliques subcellulaires et pour leur recrutement dans le complexe de signalisation multiprotéique de la voie de PKA (Barber et al., 1987; Tasken et Aandahl, 2004; Murata et al., 2009).

La versatilité et la spécificité de la voie d'AMPc-PKA sont aussi fortement modulées par les protéines kinases d'ancrage (AKAP, *A kinase anchoring proteins*). Les AKAP contribuent à l'agrégation de plusieurs complexes formés par l'interaction des multiprotéines, permettant ainsi la terminaison du signal par les PDE et le *cross-talk* entre différentes voies de signalisation cellulaire autour des substrats (Diviani et Scott, 2001; Michel et Scott, 2002; Tasken et Aandahl, 2004).

En résumé, la voie de l'AMPc est activée par la liaison d'un ligand à un GPCR et se caractérise par l'activation d'AC autour du site de liaison et par la production d'un *pool* d'AMPc. Cependant, la concentration et la distribution d'un gradient d'AMPc sont limitées par la présence des PDE. Les structures subcellulaires peuvent héberger certaines PKA qui, à leur tour, iront ancrer les AKAP localisées dans le voisinage. La formation de ce complexe aura pour effet de localiser et de limiter la voie de signalisation à une région définie de la cellule, proche du substrat de PKA (figure 1.11).

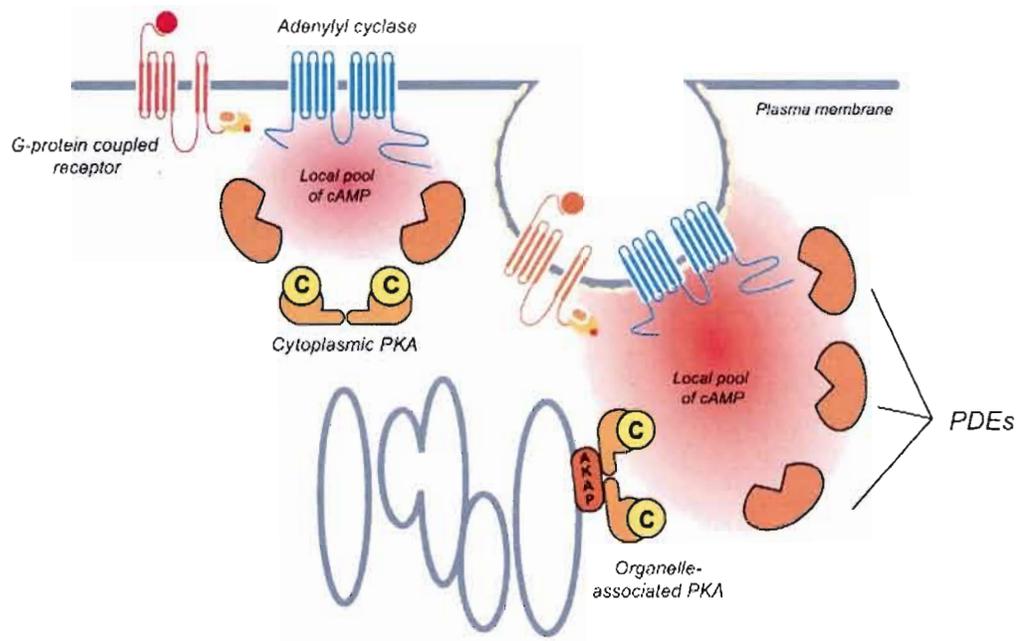


Figure 1.11 Formation du complexe multiprotéique de la voie de l'AMPC-PKA. Le complexe qui donne la versatilité et la spécificité de la voie de la PKA (*protéine kinase A*) est formé des AC activées donnant origine à un *pool* d'AMPC, de PDE (phosphodiesterases) et d'AKAP (*A kinase anchoring proteins*). (Tirée de Tasken et Aandahl, 2004.)

Suite à l'étape de formation et de compartimentalisation du complexe, l'enzyme PKA offre plusieurs réponses biologiques telles que la régulation du cycle, la prolifération et la différenciation cellulaires, la régulation de la dynamique des microtubules, la condensation et la décondensation de la chromatine, la formation de l'enveloppe nucléaire et, enfin, la régulation des mécanismes de flux d'ions et de transport intracellulaire (Tasken et Aandahl 2004). Pour induire ces réponses, une des façons utilisées par la PKA consiste à phosphoryler des récepteurs membranaires des différents facteurs cellulaires tout en diminuant leur capacité de liaison aux ligands et en diminuant aussi, par conséquence, leur activité (Cruise et

al., 1986; Pessin et al., 1983; Stadtmauer et Rosen, 1986). Une autre façon est la phosphorylation de la MAP2 (*microtubule-associated protein 2*) par la PKA qui réduit la liaison de cette protéine à la tubuline et l'actine, en causant aussi la réduction de la polymérisation microtubulaire et la dégradation protéolytique de MAP2 (Sanchez et al., 2000). Enfin, la PKA peut aussi réguler négativement les niveaux intracellulaires de Ca^{2+} par la phosphorylation du récepteur d'IP3 (*inositol phosphatidyl 3*) localisé dans le compartiment intracellulaire (Wang et al., 2005).

À l'instar des voies de signalisation cellulaire décrites antérieurement, l'AMPC joue un rôle important dans la régulation de la différenciation trophoblastique, notamment dans la phase terminale de ce processus. L'AMPC ainsi que les agents stimulateurs de l'AC affectent la synthèse d'ADN et, par conséquent, la morphologie et la fonction des cellules trophoblastiques (Feinman et al., 1986; Strauss et al., 1992; Egawa et al., 2008).

Feinman et collègues (1986) ont démontré les effets morphologiques (arrondissement cellulaire) et ultrastructurelles (augmentation du nombre de réticulum endoplasmique et modification de la taille de l'appareil de Golgi) occasionnés chez les trophoblastes en réponse à l'analogue d'AMPC (8-Br-cAMP). Par la suite, une modification fonctionnelle indépendante de la formation du syncytium par ces analogues a également été décrite (Hilf et Merz, 1989; Ulloa-Aguirre et al., 1990): elle se caractérise par l'augmentation de la synthèse d'hormone hCG à travers sa régulation post-traductionnelle (régulation de la glycosilation).

Après avoir isolé le diterpène forskolin (FKL) à partir du *Coleus forskohlii*, on est progressivement parvenu à pouvoir le décrire et à en comprendre l'effet. On pourra constater que cette étape représente un avancement des plus utiles pour l'étude de la différenciation du trophoblaste. Ce diterpène active potentiellement toutes les isoformes d'AC membranaires à l'exception de l'AC9 (Metzger and Lindner, 1981; Premont et al., 1996) et induit la différenciation morphologique et biochimique des cellules de lignée trophoblastiques originaires du choriocarcinome humain, les cellules BeWo (Wice et al., 1990). Dans ces cellules, par l'action de la forskoline, la voie de l'AMPC réduit la réplication cellulaire, cause

une augmentation du volume nucléaire et induit la fusion cellulaire (Wice et al., 1990; Taylor et al., 1991).

1.1.6. *Cross-talk* entre différentes voies de signalisation

La linéarité est une des caractéristiques les plus importantes des voies de MAPK. Cependant, plusieurs stimulations croisées (*cross-talk*) avec d'autres voies de signalisation peuvent aussi réguler les cascades de MAPK dans les différents tissus et processus cellulaires (Berra et al., 1998; Xiao et al., 2002; Katz et al., 2007). Dans les fibroblastes, par exemple, la voie d'ERK1/2 peut être régulée par une stimulation croisée avec PKC α suite à l'induction de l'activation de Ras (Kolch et al., 1993; Marais et al., 1998) ou via la voie de PI3K/Rac/Pak (*p21 serine/thréonine kinase*)/Raf-1 (King et al., 1998; Chaudhary et al., 2000).

Sharma et collègues (2003) ont aussi démontré qu'il existe une double stimulation croisée entre ERK1/2 et p38 dans les processus de migration et de prolifération des cellules épithéliales cornéennes. Ils ont également démontré un mécanisme compensatoire dans lequel l'inhibition d'une de ces deux voies résulte en forte activation de l'autre au détriment du maintien de la fonction cellulaire.

En effet, du point de vue séquentiel, dans le cas d'ERK1/2, la majorité des stimuli croisés semble avoir un effet sur un événement situé en amont de la protéine Raf. Cette réponse est due en partie à la flexibilité des protéines Raf existantes. La B-Raf, par exemple, reçoit non seulement les signaux à partir de plusieurs récepteurs des facteurs de croissance (Wellbrock et al., 2004) mais aussi à travers un mécanisme d'hétérodimérisation et de trans-phosphorylation dépendant de la protéine d'échafaudage 14-3-3 (Wan et al., 2004; Garnett et al., 2005).

1.1.7. Les fonctions du placenta

Pendant la grossesse, le placenta a plusieurs fonctions physiologiques cruciales dont le transport de substances dans les deux directions entre la mère et le fœtus. D'un côté, toutes les substances nécessaires au bon développement du fœtus (oxygène, eau, électrolytes,

hydrates de carbone, lipides, vitamines et hormones) sont transportées de la circulation sanguine maternelle à la circulation fœtale; de l'autre, les produits résultants du métabolisme fœtal (dioxyde de carbone, urée et hormones) sont éliminés à travers le placenta dans la circulation maternelle (Sasthy, 1999).

Les caractéristiques anatomiques/histologiques du placenta humain entraînent certaines particularités du transfert de substances et varient au long de la grossesse. Comme mentionné antérieurement, le placenta humain est de type hémomonochorial et le sang maternel n'est en contact avec le sang fœtal que par une barrière tissulaire formée par l'endothélium des vaisseaux fœtaux, le mésenchyme comportant les cellules de Hofbauer, le ST et les CT (voir figure 1.2) (Leiser and Kaufmann, 1994; Malassine, 2001; Evain-Brion, 2001). Au début de la grossesse, voire même au cours du premier trimestre, cet épithélium est stratifié et son épaisseur peut varier de 20 à 30 μm . À mesure qu'avance la grossesse et que le fœtus se développe, cette barrière s'amincit graduellement jusqu'à atteindre 2-5 μm à la fin de la grossesse. Cette réduction de l'épaisseur de la barrière est accompagnée de certaines modifications structurales, comme l'expansion des villosités chorioniques et des ST, ainsi que de modifications fonctionnelles, comme l'activité enzymatique de biotransformation et l'évolution quantitative et qualitative de transporteurs (McRobie et al., 1998; Clarson et al., 2003; Syme et al., 2004; Wloch et al., 2009).

De cette façon, la fonction placentaire est intimement liée à la formation dynamique de cet épithélium et les cellules épithéliales les plus importantes sont les ST. Ces cellules polynucléaires, similaires aux cellules intestinales et rénales, possèdent d'un côté une membrane externe caractérisée principalement par la présence de microvillosités, raison pour laquelle elle est appelée membrane de bordure en brosse (BBM), et présentent de l'autre une membrane basale plasmique (BPM). Les BBM forment la première interface entre le sang maternel et le tissu fœtal tandis que la BPM constitue le filtre par lequel les nutriments traverseront et atteindront la circulation fœtale. De plus, ces cellules répondent aux facteurs humoraux provenant de la circulation maternelle ou fœtale. Ces deux types de membranes possèdent des récepteurs, des transporteurs et des pompes, lesquels augmentent le transfert

net des substances nutritives (Lafond et al., 1991; Husain et Mughal, 1992; Lafond et al., 2000; Belkacemi et al., 2005a; Lafond et Simoneau, 2006).

Conséquemment, le transfert de plusieurs substances à travers le placenta dépend de certaines caractéristiques spécifiques de la barrière tissulaire. En étant constituée d'une double couche de phospholipides, la membrane plasmique du ST permet la solubilisation et le passage rapide des substances liposolubles; elle offre aussi une barrière au passage de substances hydrosolubles, comme dans l'exemple de l'ion calcium qui a besoin des pores ou de canaux de transport pour entrer ou sortir de la cellule (Willis et al., 1986; Thornburg et al. 1988; Bain et al., 1990).

Le transfert de substance à travers le placenta se fait suivant divers modes: transport actif, transport passif ou diffusion facilitée (Hoenderop et al., 2005; Wloch et al., 2009). De plus, il peut varier en qualité et en quantité (Hill et Longo, 1980; Saintonge et Rosso, 1983). En ce que concerne la quantité notamment, le transfert du Ca^{2+} nécessaire aux fonctions physiologiques telles que la formation squelettique et les activités neuromusculaires augmente progressivement en relation au développement osseux du fœtus tout au long de la grossesse (Hershberger and Tuan, 1998; Hoenderop et al., 2005; Belkacemi et al., 2005a).

1.1.7.1. Le transport placentaire du Ca^{2+}

Le placenta constitue un important site pour la régulation de l'homéostasie calcique fœtal (Hershberger and Tuan, 1998) dans laquelle sont impliqués plusieurs mécanismes de transfert (van Kreel and van Dijk, 1983; Lafond et al., 2001; Hoenderop et al., 2005). Chez les mammifères, le transfert de Ca^{2+} de la mère au fœtus s'effectue particulièrement contre un gradient de concentration puisque la concentration du calcium ionique ($[\text{Ca}^{2+}]$) est plus élevée dans le plasma fœtal (1,41 mM) que dans le plasma maternel (1,12 mM) (Husain et Mughal, 1992).

Une partie du Ca^{2+} qui se rend à la circulation fœtale utilise la voie paracellulaire et passe par les jonctions étanches (Stulc et al., 1994). Le mouvement d'ions à travers les jonctions étanches est un processus passif qui dépend du gradient de concentration d'ions

perméables et du gradient électrique à travers l'épithélium. En outre, la perméabilité des jonctions étanches est régulée de façon dynamique par plusieurs conditions physiologiques comme les facteurs de croissance, les cytokines et les hormones (Hoendenrop et al., 2005).

L'autre partie du Ca^{2+} est transférée au fœtus à travers les ST en utilisant un système constitué de multiples étapes. Premièrement, la concentration intracellulaire de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) étant plus faible (10-100 nM) que la $[\text{Ca}^{2+}]$ dans le sang maternel (1,12 mM), le Ca^{2+} entre dans la cellule simplement par mécanisme passif ou par la présence des canaux à Ca^{2+} (Kamath et al., 1992). Ensuite, à l'intérieur de ces cellules, le Ca^{2+} est transporté par les protéines de liaison au Ca^{2+} vers la BPM qui tamponne aussi la concentration intracellulaire de cet ion. Finalement, puisque la concentration calcique fœtale est plus élevée que celle retrouvée dans les ST, l'extrusion du Ca^{2+} est faite en utilisant des mécanismes de transport actif nécessitant de l'énergie, comme dans le cas, par exemple, des PMCA (*plasma membrane Ca^{2+} ATPase*) (Lafond et al., 1991; Husain et Mughal, 1992; Casart et al., 2000). Par ailleurs, les hormones comme la calcitonine, l'hormone parathyroïdienne (PTH) et le peptide apparenté à la parathormone (PTHrP) viennent aussi à l'aide des PMCA pour contrecarrer ce gradient de Ca^{2+} (Casart et al., 2000; Lafond et Simoneau, 2006; Bond et al., 2008; Perez et al., 2008) (figure 1.12).

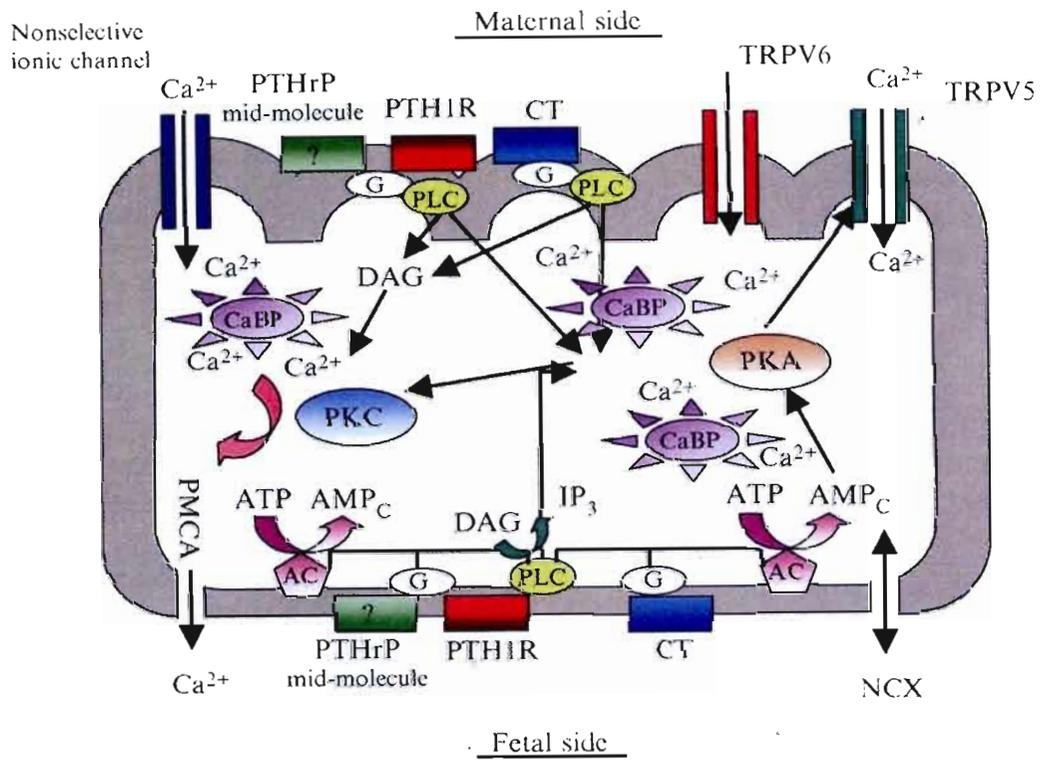


Figure 1.12 Représentation du système de transport de Ca^{2+} par le syncytiotrophoblaste (ST) humain. AC, adénylyl cyclase; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; ATP, adenosine triphosphate; Ca^{2+} , ion calcium; CaBP, calcium-binding proteins; CT, calcitonin receptor; DAG, diacylglycerol; G, protéine G; IP_3 , inositol-1,4,5-triphosphate; PKA, protein kinase A; PKC, protein kinase C; PLC, phospholipase C; PTH1R, parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor; PTHrP mid-molecule, probable récepteur qui se lie au fragment intermédiaire de la PTHrP; TRPV, transient receptor potential, vanilloid family. (Tirée de Lafond et Simoneau, 2006.)

1.1.7.1.1 Entrée du Ca^{2+} dans le ST

Le transport actif transépithélial du Ca^{2+} est un processus dirigé par le gradient électrochimique et contrôlé par la présence de canaux sélectifs de Ca^{2+} . Dans le placenta, ce transport actif du Ca^{2+} utilise les canaux d'entrée VDCC (*voltage-dependent calcium channels*) et SOC (*store operated channels*).

1.1.7.1.1.1. Les canaux VDCC (voltage-dependent calcium channels)

Les canaux VDCC sont des protéines transmembranaires trouvées dans plusieurs types de cellules qui permettent l'entrée rapide du Ca^{2+} (Tsien et al., 1991). Selon leur capacité d'activation, ces canaux peuvent être classifiés en deux groupes. Le premier groupe est constitué des canaux HVA (*high voltage-activated*) et inclut les types L, N, P/Q et R. Ces canaux sont activés par un courant de -40 à -10 mV. Le deuxième groupe est constitué par les canaux LVA (*low voltage-activated*), qui ont la particularité d'être activés par un courant de -60 à -70 mV et d'inclure seulement le type T (Stea et al., 1995; Huguenard, 1998; Yamakage et Namiki, 2002).

Jusqu'à présent, seuls les types T et L ont été retrouvés dans le placenta (Meuris et al., 1994; Courdec et al., 1995; Cemerikic et al., 1998; Williams et al., 1999; Robidoux et al., 2000; Belkacemi et al., 2005a; Liu et al., 2005; Lafond et Simoneau, 2006; Jakoubek et al., 2006). De plus, leur fonction dans ce type de cellule n'est pas bien établie. Le peu d'études existant démontrent l'association des VDCC de type L à la signalisation cellulaire et à la régulation hormonale (Robidoux et al., 2000) mais pas à l'influx du Ca^{2+} (Moreau et al., 2003). En ce qui concerne les VDCC de type T, une étude réalisée par Liu et al. (2005) a démontré que l'action inhibitoire de l'ocytocine sur ces canaux est davantage une fonction reliée au remodelage du signal utérin au moment de l'accouchement qu'une fonction reliée au transport actif du Ca^{2+} à travers le placenta.

1.1.7.1.1.2. Les canaux SOC (*store operated channels*)

Les SOC jouent un rôle fondamental dans la régulation aussi bien à court qu'à long terme des cellules non excitables afin de maintenir l'homéostasie du Ca^{2+} intracellulaire (Ca^{2+}_i). Lorsque les niveaux de Ca^{2+}_i sont diminués, les dépôts intracellulaires de Ca^{2+} génèrent un signal qui entraîne l'ouverture des SOC dans la membrane cellulaire et détermine l'influx de Ca^{2+} (Berridge, 1995; Putney, 1986). Un tel signal semble être relié à l'association moléculaire directe entre le récepteur de IP3 (*inositol 1,4,5-triphosphate*) et les SOC (Putney, 1990; Parekh et Putney, 2005) (figure 1.13). Aussi, un autre mécanisme de régulation de l'entrée de Ca^{2+} dans les cellules non excitables associé indirectement au SOC est le mécanisme modulé par la stimulation de la phospholipase C γ (PLC γ). L'activation de cet effecteur par un agoniste se fait normalement à travers la protéine $G_{q/11}$. Cette activation induit la production de 1,2-diacylglycerol (DAG) ainsi que la production de IP3 qui, à son tour, induira la libération de Ca^{2+} des dépôts intracellulaires sensibles à l'IP3 puis l'activation subsequente de SOC (Kiselyov et al., 1999).

Particulièrement, dans les trophoblastes des placentas humains à terme, les SOC forment une importante porte d'entrée pour le Ca^{2+} et ils assurent la régulation de la synthèse et de la sécrétion de CRF (*corticotropin-releasing factor*), régulation modulée par le neuropeptide Y (Robidoux et al., 2000; Clarkson et al., 2003).

Dans les ST, les canaux de Ca^{2+} impliqués dans le processus de SOC sont membres de la famille des TPR (*transient receptor potential*) (Harteneck et al, 2000). Cette famille est divisée en trois groupes principaux: les TRPC (pour *canonical* ou *classical*), les TRPV (pour *vanilloid*) et les TRPM (pour *melastatin*) (Montell, 2001). Les TRPV, plus spécifiquement TRPV-5 (ou Cat2) et TRPV-6 (ou Cat1), sont des canaux fortement sélectifs au Ca^{2+} et, de ce fait, d'efficaces régulateurs du taux d'influx actif de cet ion (Hoenderop et al., 1999; Hoenderop et al., 2001).

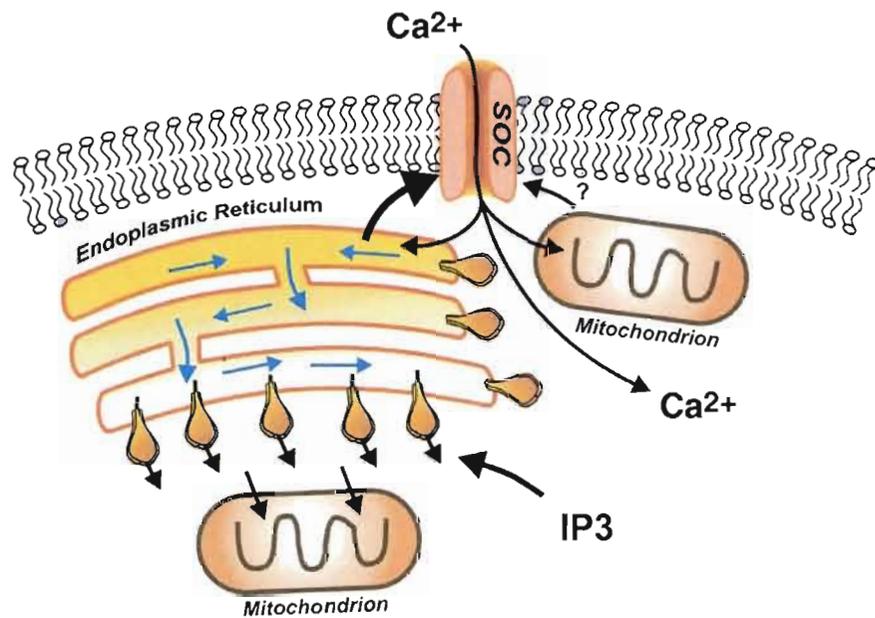


Figure 1.13 Mécanisme de régulation des SOC par le signal provenant des organelles telles que la mitochondrie et le réticulum endoplasmique (RE), responsables du tamponnage de Ca^{2+} , IP3, inositol phosphate 3. Les SOC sont activés par le signal provenant du RE. La capacité tamponnante de Ca^{2+} du RE et de la mitochondrie aide l'activation de SOC à travers le tamponnement du Ca^{2+} proche à l'entrée du canal. De plus, la mitochondrie située proche au récepteur de InsP3 du RE tamponne la sortie du Ca^{2+} et réduit l'inhibition de la libération du Ca^{2+} par les canaux de récepteur de InsP3. Finalement, la mitochondrie 'energisée' semble (?) être capable de réguler positivement la fonction des SOC par un mécanisme indépendante de Ca^{2+} (Tirée de Parekh et Putney, 2005.)

TRPV-5 et -6 sont deux membres homologues de la famille TRPV dont les gènes, constitués de 15 exons, sont juxtaposés dans le chromosome humain 7q35 (Muller et al., 2000b; Hoenderop et al., 2001; Peng et al., 2001). Leur protéines ont un poids moléculaire d'environ 80 KDa et comprennent 730 acides aminés dont les séquences sont identiques à 76% (Weber et al., 2001).

La structure tridimensionnelle de ces canaux indique la formation de six segments transmembranaires et une région formant un pore entre les segments 5 et 6. De plus, ils ont deux longues terminaisons, amine (NH_2) et carboxyle (COOH), qui sont localisées dans le cytosol et contiennent les motifs de liaison aux protéines formés par plusieurs (environ 33) résidus contenant deux hélices- α séparées par une boucle, les répétitions d'ankyrine, les motifs de liaison aux protéines PDZ et les sites de phosphorylation par PKC (Hoenderop et al., 2003; Hoenderop et al., 2005) (figure 1.14). Le déterminant de la sélectivité au Ca^{2+} , qui est en même temps le site de perméabilité des canaux TRPV-5 et -6, est situé dans la région qui forme le pore, au niveau du résidu aspartate Asp542, pour le TRPV-5, et Asp541, pour le TRPV-6 (Nilius et al., 2001a,b; Voets et Nilius, 2003).

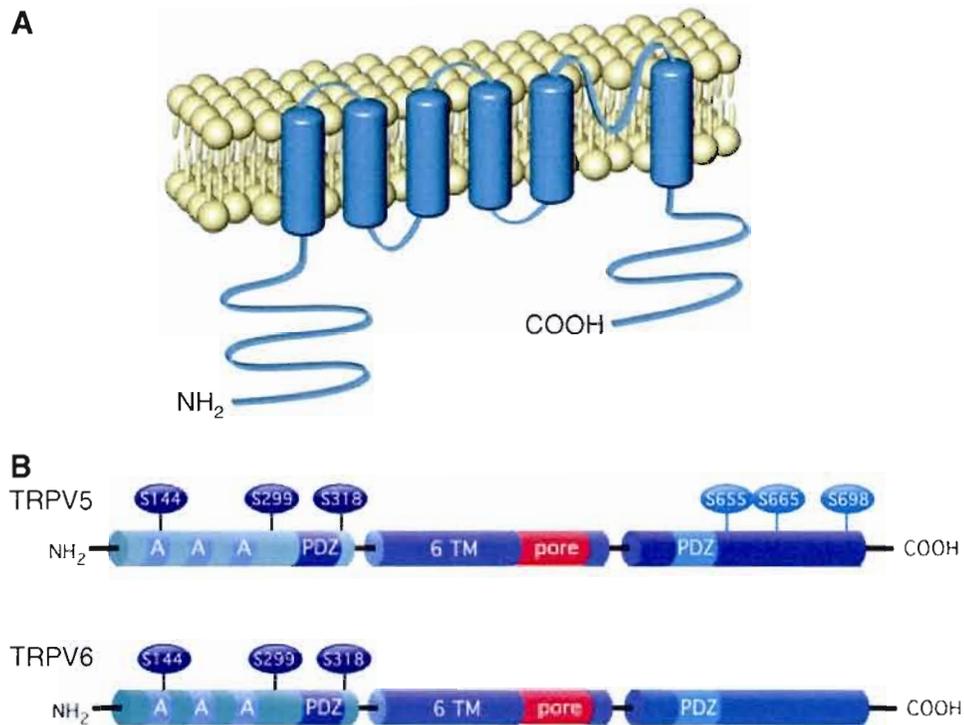


Figure 1.14 Organisation structurale des TRPV-5 et TRPV-6. Ces canaux sont constitués d'un domaine principal formé par 6 segments transmembranaires (TM), d'une région formatrice du pore entre TM5 et TM6 et de deux longues queues amine (NH₂) et carboxyle (COOH) situées dans le cytosol. A: structure tertiaire et localisation transmembranaire; B: structure primaire et indication des probables sites de régulation présents dans les terminaisons NH₂ et COOH comme les répétitions ankyrine, les motifs PDZ et les éventuels sites de phosphorylation par PKC (sphères bleues) (Tirée de Hoenderop et al., 2005.)

Les études démontrent la présence de ces canaux dans le placenta et leur implication dans le transport du Ca^{2+} . Cependant, l'expression du TRPV-6 est plus abondante que celle du TRPV-5 dans le tissu placentaire ainsi que dans les CT et ST isolés *in vitro* (Peng et al., 2000; Peng et al., 2001; Wissenbach et al., 2001; Moreau et al., 2002a,b). Dans ces derniers, non seulement l'expression de TRPV est croissante au fil de la différenciation des CT, mais ils sont également localisés dans la BBM, indiquant leur importance pour le processus adaptatif du transport transcellulaire du Ca^{2+} par les ST (Lafond et Simoneau, 2006).

L'activité biologique de TRPV-5 et -6 est un processus fortement régulé et coordonné. Schoeber et collègues (2007) ont proposé un modèle intégré du transport du Ca^{2+} par les TRPV-5 et -6 dont quatre sortes de mécanismes sont connus : 1) régulation de la transcription et de la traduction par les hormones calcitropiques telles que la Vitamine D, la PTH et l'œstrogène; 2) régulation de leur activité dépendante du pH et du Ca^{2+} ; 3) régulation du transfert des molécules (*trafficking*) vers la membrane cellulaire; 4) régulation par l'association de différentes protéines. Les protéines de liaison localisées à proximité des canaux, comme dans le cas de la Calbindin-D28K, peuvent réguler leur activité en tamponnant le Ca^{2+} libre, en hydrolysant les hydrates de carbone de la terminaison-N extracellulaire pour rendre les canaux plus disponibles à l'intérieur de la cellule (ex. *anti-aged hormone* Klotho) ou simplement en se liant aux canaux dans leur domaine intracellulaire par un mécanisme dépendant de la vitamine D (ex. *B-box and SPRY-domain-containing protein*, BSPRY) (figure 1.15).

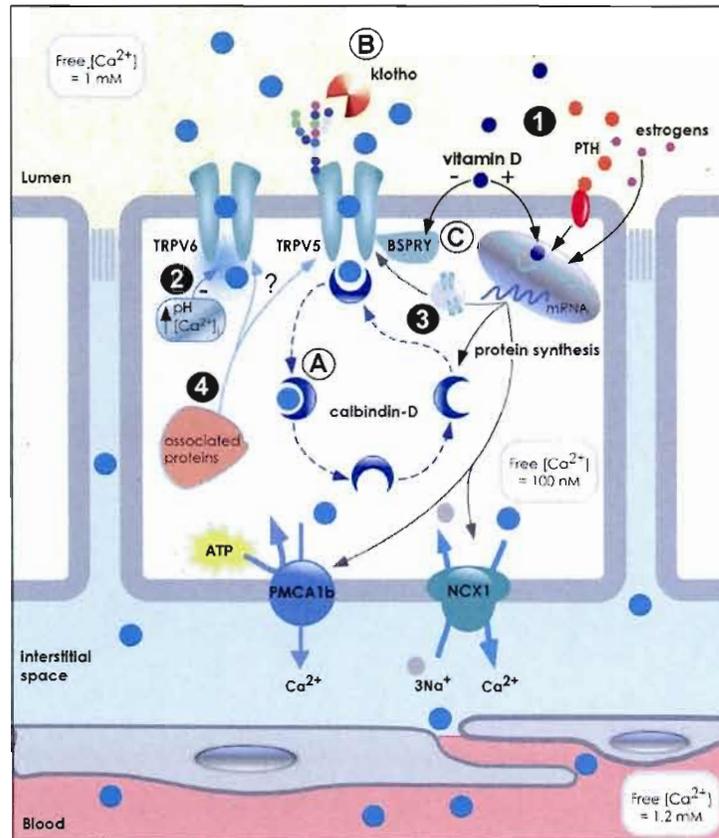


Figure 1.15 Modèle intégré de transport actif du Ca^{2+} dans la cellule épithéliale et régulation des TRPV-5 et -6. 1) Liaison des hormones calciotropiques telles que la Vitamine D, la PTH (*parathyroid hormone*) et l'estrogène; 2) Activité dépendante du pH et du Ca^{2+} ; 3) Transfert des molécules (*trafficking*) vers la membrane cellulaire; 4) Association de différentes protéines comme Calbindin-D (A), Klotho (B) et BSPRY (*B-box ans SPRY-domain-containing protein*) (C). (Tirée de Schoeber et al., 2007.)

Par ailleurs, des études sur les 'Drosophile' nous démontrent que la biophysique, la pharmacologie et l'expression de TRPV-5 et -6 peuvent être modifiées par la présence et l'interaction directe avec certaines protéines régulatrices, comme la calmoduline (CaM) (Li et Montell, 2000). D'autres études, portant sur les cellules humaines, ont fait ressortir qu'un mécanisme de compétition entre la PKC et la CaM semble avoir lieu dans la régulation de l'influx du Ca^{2+} ; elles décrivent l'inactivation rapide de TRPV-6 par liaison directe du Ca^{2+} à la portion intracellulaire de la région poreuse et en arrivent à la conclusion qu'elle est peut-être le mécanisme de régulation le plus important (Niemeyer et al., 2001).

Il existe un mécanisme de régulation de la transcription génomique des TRPV-5 et -6 par le métabolite actif de la vitamine D, le $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, et par l'œstrogène. Les travaux de nombreux chercheurs (Muller et al., 2000a,b; Weber et al., 2001; Hoenderop et al., 2001) ont prouvé l'existence de ce mécanisme par la présence des VDRE (*Vitamin-D-responsive elements*) dans la région promotrice du gène de TRPV-5 et par la modification dans la transcription du gène de TRPV-5 en absence du $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

1.1.2.1.2. Régulation du Ca^{2+} intracellulaire

Le Ca^{2+} joue un rôle clé dans la régulation du métabolisme cellulaire et de l'expression génique. La concentration de 10-100 nM du Ca^{2+} dans le cytosol est maintenue en équilibre avec l'environnement extracellulaire et le lumen du réticulum endoplasmique (RE), un des plus importants lieux de stockage du Ca^{2+} dans les cellules non excitables (Meldolesi et Pozzan, 1998).

La rupture de l'homéostasie calcique entraîne le déséquilibre des fonctions cellulaires. Par exemple, une élévation du Ca^{2+} dans le cytosol peut causer l'activation des enzymes de dégradation et conduire soit à la mort cellulaire (Trump et Berezsky, 1996), soit à l'activation de plusieurs signaux de transduction suivie de la transactivation de certains gènes (Pahl et Baeuerle, 1997).

Ainsi, les cellules impliquées dans le transport transcellulaire du Ca^{2+} sont continuellement mises au défi par un trafic substantiel de cet ion dans le cytosol afin de maintenir les niveaux physiologiques intracellulaires du Ca^{2+} . Un des modèles qui expliquent ce transport est un système de 'navette' dans lequel les protéines liant le Ca^{2+} , les *calbindin* (ou CaBPs, *Ca²⁺-binding proteins*), facilitent la diffusion de cet ion entre les surfaces apicale et basolatérale de la cellule suite ou non à une stimulation par la Vitamine D (Calbindin-D) (Bruns et al., 1988; Hoenderop et al., 2005; Bronner, 2001; Slepchenko et Bronner, 2001). Ces CaBP contrôlent alors le déplacement du Ca^{2+} cytosolique de la BBM vers la BPM, la disponibilité et le stockage du Ca^{2+} dans les cellules, en plus de réguler directement ou indirectement l'activité des Ca^{2+} -ATPases dans la BPM (Kretsinger, 1980a,b; Berridge, 1987; Carafoli, 1987; Christakos et al., 1989).

Toutefois, il importe de dire que le mécanisme d'action exacte des CaBP n'est pas encore établi. Le transfert du Ca^{2+} par ces protéines semble être affecté par plusieurs hormones telles que la vitamine D, l'œstrogène et la PTHrP (Tuan et al., 1991; Hershenberg et Tuan, 1998; Belkacemi et al., 2002; Belkacemi et al., 2005b). En fait, Tuan et collègues (1991) et Belkacemi et collègues (2005b) ont démontré que $1,25\text{-[OH]}_2\text{D}_3$ augmente l'expression de CaBP au niveau génique et protéique dans le trophoblaste.

De plus, à travers l'interaction avec les protéines membranaires de transport du Ca^{2+} , comme la TRPV-5, les CaBP semblent aussi participer de façon dynamique au contrôle du transport du Ca^{2+} . Dans leur étude, Lambers et collègues (2006) ont observé qu'une faible $[\text{Ca}^{2+}]_i$ entraîne la translocation de la CaBP28k vers la membrane cellulaire suivie d'une association à la TRPV-5. Au bord de la membrane, dans les environs immédiats de la TRPV-5, la CaBP28k tamponne le Ca^{2+} et stimule l'influx de Ca^{2+} par ce canal.

Enfin, chez l'humain, plusieurs CaBP ont été caractérisées dans le placenta: CaBP9k, CaBP28k, CaBP57k, Oncomoduline, S-100P, S-100 β , S-100 α et TCTP (*translationally controlled tumor protein*) (Hershenberg et Tuan, 1998; Belkacemi et al., 2002; Acuri et al., 2005; Belkacemi et al., 2005a; Lafond et Simoneau, 2006). Parmi toutes ces protéines, nous avons arrêté notre choix pour cette étude sur les CaBP28k et TCTP parce que ces deux

protéines de liaison constituent des cibles extrêmement intéressantes pour l'étude des effets des agents extrinsèques sur le mécanisme adaptatif du transport du Ca^{2+} par les trophoblastes. L'intérêt de ces cibles réside tout particulièrement dans leur ubiquité, dans leur rôle dans l'homéostasie du Ca^{2+} intracellulaire et dans leur influence sur la régulation de l'expression protéique.

1.1.7.1.2.1. CaBP28k (*calbinding protein 28 K*)

La CaBP28k, aussi dénommée CALBI ou Calbindin- $\text{D}_{28\text{k}}$, a été caractérisée initialement dans l'intestin des volailles (Wasserman et al., 1966). Par la suite, cette protéine a aussi été trouvée dans plusieurs tissus de mammifère tels que le tissu rénal, osseux, cérébral, pancréatique et placentaire (Christakos et al., 1989; Thomasset et al., 1981; Belkacemi et al., 2003).

La CaBP28k appartient à la famille des CaBP et à la super famille des troponines-C. Ces protéines présentent le motif spécifique d'hélice-boucle-hélice, ou motif *EF-hand*, qui a une haute affinité pour le Ca^{2+} (Kretsinger, 1980a,b; Nakayama et Kretsinger, 1994; Kawasaki et al., 1998). La CaBP28k contient six motifs *EF-hand* et dû à la présence de ces motifs, en plus de fonctionner comme tampon, elle est aussi considérée comme une « sonde » de Ca^{2+} . La liaison du Ca^{2+} à ce motif entraîne des modifications importantes dans la conformation protéique relié à l'activité de la CaBP28k (Berggard et al., 2002; Venters et al., 2003). La structure « apo » représente un état ordonné qui, subissant une modification, passe à la structure désordonnée « holo » en présence de Ca^{2+} . Une fois que sa capacité maximale de liaison du Ca^{2+} (4 ions) est atteinte, la molécule libère ces ions et revient à son état « apo » (Kojetin et al., 2006; Hobbs et al., 2009) (figure 1.16).

La CaBP28K est une protéin liant le Ca^{2+} , de masse moléculaire de 28 KDa formée par une seule chaîne polypeptidique de 261 acides aminés. Cette chaîne est composée de quatre domaines actifs de liaison au Ca^{2+} et de deux domaines qui ont probablement perdu leur capacité de liaison au Ca^{2+} (Fullmer et Wasserman, 1987; Parmentier et al., 1987; Wood et al., 1988).

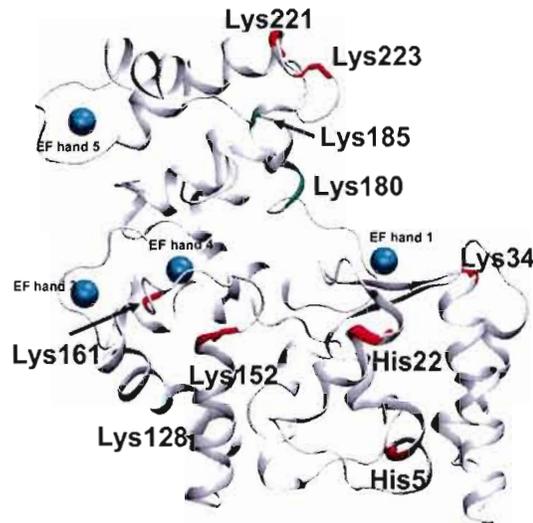


Figure 1.16. Modèle computationnel de la forme « holo » de la CaBP28k. Les résidus marqués en rouge (Lys34, Lys152, Lys161, His5, His22) et en vert (Lys180 et Lys185) sont responsables des changements de la réactivité et de la conformation suite à la liaison au Ca^{2+} (sphères bleues). Les *EF hands* 1, 3, 4 et 5 sont aussi représentés. (Tirée de Hobbs et al., 2009.)

La présence de CaBP28k dans le trophoblaste confirme son implication dans le processus de régulation calcique du placenta. L'expression d'ARNm et de protéine de la CaBP28k pendant la différenciation du trophoblaste *in vitro* est reliée à l'augmentation de l'influx de Ca^{2+} par les ST et coïncide avec l'augmentation du besoin fœtal de Ca^{2+} durant le troisième trimestre de grossesse (Moreau et al., 2002a,b; Belkacemi et al., 2003, 2004). De plus, la régulation positive de cette protéine par la $1,25\text{-[OH]}_2\text{D}_3$ a été démontrée dans les cellules trophoblastiques de lignée JEG-3 (Belkacemi et al., 2005b).

1.1.7.1.2.2. TCTP (translationally controled tumor protein)

TCTP, aussi dénommé TPT1, fortilin, p21, q23 et p23, est une protéine ubiquitaire hautement conservée, exprimée dans les règnes animal et végétal (Gachet et al., 1999; Bommer et Thiele, 2004). Initialement, TCTP était considérée comme une protéine tumorale régulée au niveau traductionnel, d'où son nom *translationally controled* (Gross et al., 1989). Plus tard, l'identification de cette protéine dans plusieurs cellules et tissus normaux a démontré que non seulement elle n'était pas spécifique aux cellules tumorales mais encore que cette protéine pouvait aussi être régulée au niveau de la transcription (Sanchez et al., 1997; Xu et al., 1999).

La TCTP est une protéine importante pour les processus biologiques tels que la croissance cellulaire (Thomas et Thomas, 1986; Bohm et al., 1989), la libération d'histamine par les basophiles (MacDonald et al., 1995), l'interaction avec les microtubules (Rinnerthaler et al., 2006) et la prévention de l'apoptose (Li et al., 2001; Rhinnerthaler et al., 2006). Leur rôle dans ces processus résulte d'une forte régulation de l'expression génomique suite à plusieurs stimuli extracellulaires. Les cytokines et les signaux de croissance induisent rapidement et invariablement la synthèse de TCTP. Par contre, il arrive qu'une inhibition au lieu d'une augmentation de l'expression de TCTP soit déterminée par les signaux pro-apoptotiques/cytotoxiques et le stress cellulaire occasionné par choc thermique, privation de nutriments, stress calcique ou présence de métaux (révisé par Bommer et Thiele, 2004).

Outre la régulation de l'expression de TCTP, deux autres mécanismes, à savoir la phosphorylation par la kinase « polo » et l'interaction avec les protéines régulatrices (ex.: MCL1, *myeloid cell leukemia protein*), ont été décrits comme mécanismes par lesquels la TCTP joue un rôle dans la régulation de la croissance et du cycle cellulaire (Gachet et al., 1999; Li et al., 2001; Yarm, 2002).

L'expression différenciée et l'implication de la TCTP dans le transport du Ca^{2+} par les ST placentaires ont également été documentées. Arcuri et collègues (2005) ont démontré

que l'expression de TCTP varie par rapport à l'âge gestationnel et est reliée à la régulation du transport du Ca^{2+} par les trophoblastes.

L'alignement des séquences de différentes espèces animales et végétales a démontré qu'un total de 9% des acides aminés sont conservés. La structure tridimensionnelle indique la présence d'un domaine principal formé par le feuillet β , une boucle flexible et un domaine hélice. La présence de résidus conservés ainsi que sa forme pliée, de façon similaire aux chaperonnes liant les protéines Rab, démontrent l'importance de ce domaine pour les interactions moléculaires. En conséquence, le domaine principal permet la classification des TCTP comme protéines similaires aux chaperonnes, quoique la boucle flexible et le domaine hélice donnent une identité particulière aux TCTP. De plus, c'est le domaine hélice qui contient les régions de liaison à la tubuline et au Ca^{2+} (Kim et al., 2000; Bommer et Thiele, 2004).

La structure génomique de la TCTP des mammifères se caractérise par une organisation en cinq introns et six exons et contient un promoteur TATA-box et plusieurs autres éléments promoteurs qui sont conservés entre les espèces. Ces gènes sont transcrits en deux ARN messagers de région 3'-UTR de différentes longueurs (Thiele et al., 1998). Les ARN de la TCTP présentent au début de leur extrémité 5'-UTR une séquence TOP (*terminal oligopyrimidine tract*) qui est une caractéristique spécifique des groupes d'ARN contrôlés au niveau de traduction. Dans cette même extrémité, une région riche en GC- (environ 80%) indique un haut degré de structures secondaires qui rendent l'ARN sujet à la régulation au niveau de la traduction par la PKR (*dsRNA-activated protein kinase*) (Bommer et al., 2002; Bommer et Thiele, 2004) (figure 1.17).

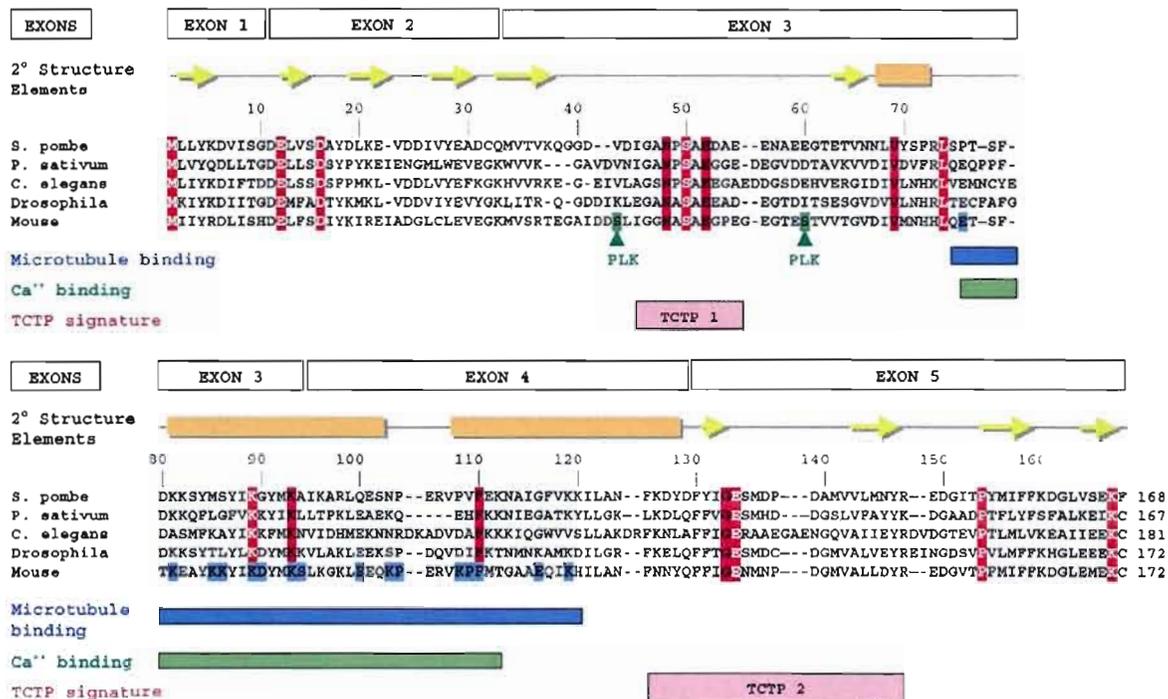


Figure 1.17 Séquence conservée et identification des séquences fonctionnelles de la TCTP chez différentes espèces. Résidus invariable sont marqué en rouge; Résidus conservés sont marqué en rose; Sequence de résidus de la souris qui coïncident avec les résidus de liaison à la tubuline chez l'humain sont marqué en bleu; Résidus de serine possible de phosphorylation sont marqué en vert. Feuillet β : fleches jaunes; Hélices : barres oranges; Region de boucle flexible : ligne grise; site de liaison à microtubules : barre bleu; site de liaison au Ca^{2+} : barre verte; signature de TCT : barre rose. (Adaptée de Bommer et Thiele, 2004.)

1.1.7.1.3. L'expulsion du Ca^{2+} par les ST

Dans les cellules spécialisées dans le transport actif, l'efflux du Ca^{2+} se passe contre un important gradient électrochimique dans les membranes basales. Dans ces membranes, et notamment dans le cas de la BPM du placenta, le mécanisme clé de ce transport actif est l'extrusion de l'ion par les échangeurs de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) et par les pompes à Ca^{2+} dépendantes de l'ATP, les PMCA (Zylinska et Soszynski, 2000; Hoenderop et al., 2005; Belkacemi et al., 2005a).

1.1.7.1.3.1. NCX (*sodium/calcium exchangers*)

Les NCX sont des co-transporteurs qui permettent l'échange de trois Na^+ contre un Ca^{2+} à travers la membrane plasmique de plusieurs cellules. Ils sont des molécules de faible affinité au Ca^{2+} mais de haute capacité de translocation du Ca^{2+} , jouant ainsi un rôle parallèle aux PMCA (Linck et al., 1998; Blaustein et Lederer, 1999; Blaustein et al., 2002).

La fonction des NCX dans le placenta est controversée. Kamath et collègues (1994) et Kamath et Smith (1994) ont démontré le rôle des NCX dans le transport à travers le ST et dans la régulation du $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Par contre, Moreau et collègues (2001), en analysant l'efflux du Ca^{2+} par les cellules trophoblastiques de lignées BeWo, ne sont pas arrivés au même résultat et n'ont pas confirmé l'implication de ces échangeurs dans le transport du Ca^{2+} sous condition basale.

1.1.7.1.3.2. PMCA (plasma membrane calcium ATPase)

Les PMCA sont les composants de la BPM les plus importants au mécanisme d'extrusion de l'excès du Ca^{2+} du cytosol des ST. Chez les mammifères, ces protéines aux propriétés enzymatiques sont codées par quatre gènes (PMCA1 à 4) et peuvent former, en raison de l'épissage alternatif, plus de vingt variants. Ces quatre types de PMCA sont très répandus: on trouve les types 1 et 4 dans tous les tissus; alors que les types 2 et 3 sont restreints à certaines cellules spécialisées comme les neurones et les trophoblastes (Guerini, et al., 1998; Zylinska et al., 2002; Moreau et al., 2002a,b; Kip et al., 2006).

Les PMCA sont composées de dix domaines transmembranaires et de deux boucles cytoplasmiques principales qui correspondent, respectivement, au domaine de transduction et au domaine catalytique. Le domaine de transduction est formé par un site de liaison aux phospholipides (région LD) et par les domaines d'auto-inhibition. Le domaine catalytique comprend le site de liaison à l'ATP et les résidus d'Asp qui sont importants pour le cycle de transport du Ca^{2+} (Di Leva et al., 2008; Zylinska et Soszynski, 2000) (figure 1.18).

De plus, les PMCA présentent dans leur extrémité carboxyle (-C) un domaine PDZ de liaison de la PKA, la PKC et la CaM. C'est dans cette extrémité que se trouve la variabilité des variants des PMCA et, par conséquent, le site de liaison aux différentes protéines régulatrices telles que les kinases et les protéines d'échafaudage (Baggaley et al., 2007; Aartsen et al., 2009) (figure 1.18).

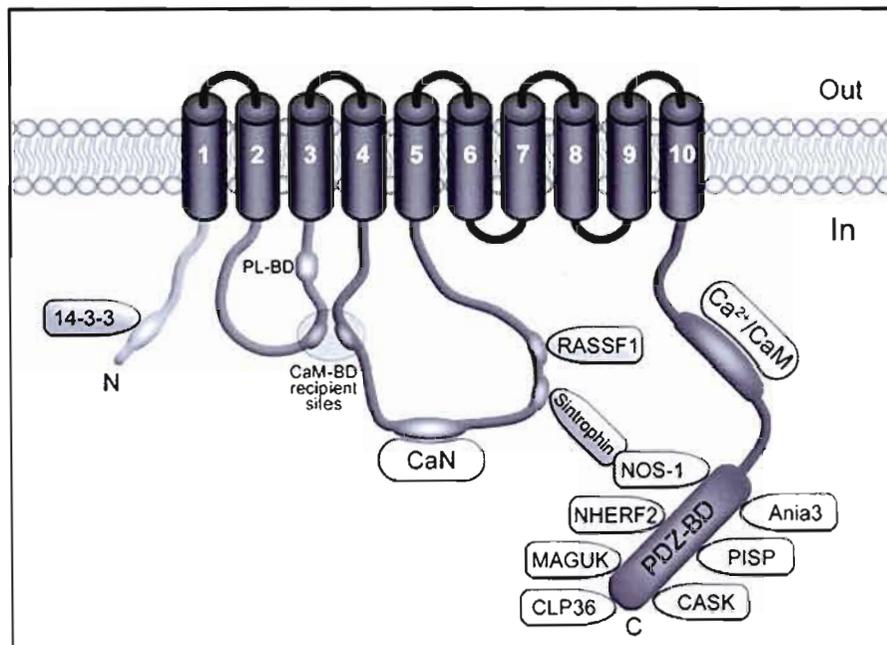


Figure 1.18 Schéma de la topologie de la PMCA et des protéines de liaison. L'interaction avec la plupart des protéines partenaires est située dans le domaine PDZ de l'extrémité carboxyle (C). D'autres protéines se lient à travers l'extrémité amine (N) et la boucle principale intracellulaire. Les sites d'interaction avec la calmoduline (CaM-BD), le domaine de liaison à PDZ (PDZ-BD), et les domaines de liaison aux phospholipides (PL-BD) sont aussi représentés. CaN: calcineurine. (Tirée de Di Leva et al., 2008.)

L'activation des PMCA est surtout modulée par la fluidité des composants lipidiques et protéiques de la membrane basale. De plus, l'affinité des PMCA pour le Ca^{2+} peut augmenter par la liaison de certaines molécules, telles que la CaM, la PKC, la PTHrP ou les phospholipides acidiqes (Kovacs et al., 1996; Kosk-Kosicka et al., 1997; Di Leva et al., 2008). L'hormone PTHrP, par exemple, semble stimuler les PMCA de la BPM à travers l'activation de la voie de DAG-PKC (*Inositolphosphate-diacylglycerol-proteine kinase C*) (Lafond et al., 1991; Strid et al., 2002).

Contrairement à la plupart des transporteurs mentionnés jusqu'ici, l'expression des PMCA n'est pas modifiée au cours du développement de la grossesse. Cependant, l'activité des ces pompes semble augmenter linéairement au niveau du troisième trimestre de gestation (Strid et Powell, 2000). Dans le placenta humain, les PMCA sont situées spécialement dans la BPM du ST et jouent un rôle important dans le transfert actif du Ca^{2+} vers le fœtus (Fisher et al., 1987; Lafond et al., 1991; Strid et al., 2003). Toutefois, Marin et collègues (2008) ont récemment décrit la localisation et l'activité des PMCA dans la BBM, ce qui suggère une action de ces enzymes dans un mécanisme de retro-transfert de Ca^{2+} du fœtus vers le sang maternel.

1.2 La biologie des plantes médicinales

La phytothérapie peut être vue comme un précurseur de la pharmacologie moderne. Au fil du temps, les plantes ont fourni un grand nombre de molécules servant de matière première à plusieurs drogues synthétiques. Ces molécules sont d'excellents outils pour la caractérisation des processus biologiques humains dans les essais *in vitro* et pour le traitement de certaines maladies (Williamson et al., 1996).

Au plan historique, bien qu'on ait constaté durant une certaine période, plus précisément de 1864 au début de ce siècle, une tendance à vouloir bannir la médecine par les plantes, leur utilisation comme source de médicaments et de nouvelles molécules actives a beaucoup gagné en popularité depuis quelques années. Le nombre d'études sur l'élucidation des phénomènes physiologiques et biochimiques reliés aux plantes a également connu une hausse importante. Cela s'explique principalement par deux causes: d'abord, la perspective pour les pays en voie de développement de pouvoir utiliser de façon « scientifiquement validée » les plantes médicinales connues depuis plusieurs générations; puis, la « révolution verte » mondiale, qui tend à véhiculer la croyance voulant que les remèdes d'origine naturelle sont plus sécuritaires et moins dangereux pour le corps humain que les drogues synthétiques (Rates, 2001).

Sur le plan biologique, il est intéressant de constater que les molécules végétales ayant donné origine aux produits synthétiques, ou étant elles-mêmes des produits actifs de plantes médicinales, proviennent de diverses routes métaboliques. Ces molécules peuvent être soit communes à plusieurs organismes vivants, soit très spécifiques au niveau du métabolisme végétal. La base principale de ce métabolisme est la production par photosynthèse des hydrates de carbone de faible masse moléculaire, les « oses ». C'est à partir de ces « oses » que le métabolisme végétal peut suivre deux routes: le métabolisme primaire, qui donne origine aux métabolites nécessaires à la survie de la plante (hydrates de carbone, lipides, protéines et acides nucléiques), et le métabolisme secondaire, qui donne naissance à une variété infinie de substances dont les rôles dans la plante sont assez variés (figure 1.19) (Santos, 1999).

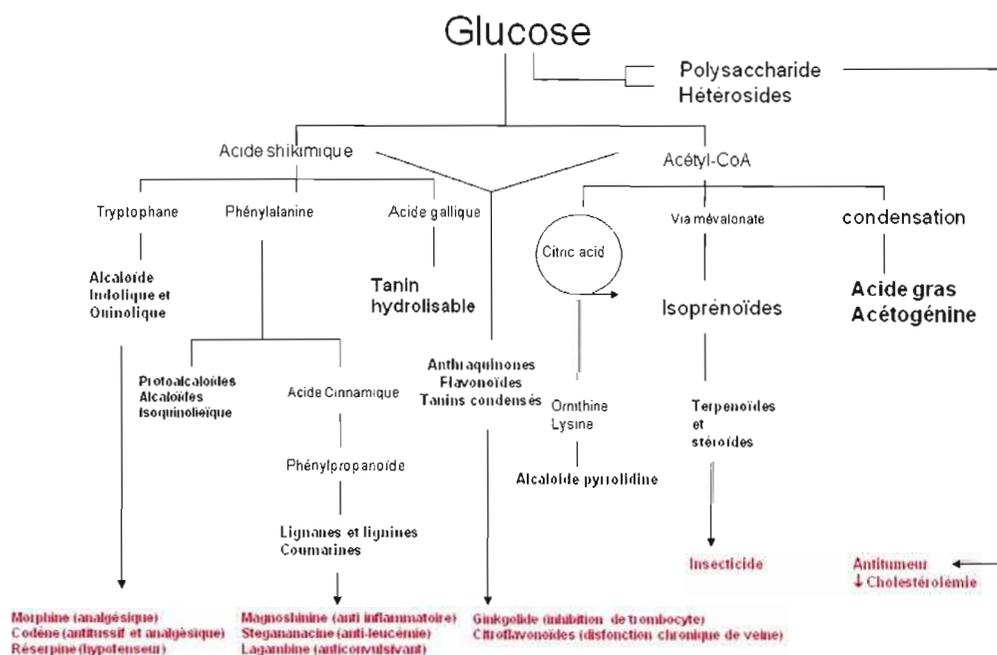


Figure 1.19 Biosynthèse des substances originaires du métabolisme secondaire et quelques exemples de leurs applications pharmacologiques. (Adaptée de Santos, 1999.)

Bien que les routes métaboliques soient divisées en primaire et secondaire, elles peuvent s'entrecroiser. Plusieurs composés peuvent être issus des modifications d'acides aminés, d'acides gras ou de sucres. De plus, certaines substances, classifiées comme secondaires en fonction de leur route métabolique d'origine, sont considérées comme

essentielles au développement végétal et jouent un rôle important comme régulateurs endogènes (Iriti et Faoro, 2009; Fim et Jones, 2009).

Les métabolites secondaires sont surtout importants pour la survie individuelle du végétal et sa perpétuation dans l'écosystème. Ils peuvent, par exemple, lui servir de mécanisme d'attraction et/ou de défense. Toutefois, à l'image même de la grande biodiversité végétale, plusieurs de ces substances présentent différentes activités biologiques qui peuvent varier entre les familles de plantes ou entre les espèces de la même famille. Outre leurs fonctions pour les végétaux, un grand nombre de ces métabolites présentent des propriétés pharmacologiques extrêmement prometteuses, justifiant par là les grands efforts de recherche dirigés vers les substances médicinales dans les plantes (Santos, 1999).

La production des métabolites secondaires par les végétaux est une tâche extrêmement spécialisée et dynamique. D'abord, la production des métabolites secondaires résulte de l'interaction complexe entre biosynthèse, stockage et dégradation. Même si toutes les cellules sont capables de synthétiser les métabolites secondaires, la biosynthèse est restreinte à certains organes végétaux. Puis, les routes de la biosynthèse des produits du métabolisme secondaire sont activées de façon particulière durant certaines étapes du développement végétal ou en situation de stress causée par des limitations nutritionnelles ou par l'agression de microorganismes. Une fois synthétisés, les métabolites sont transférés et stockés dans différents lieux. Enfin, les processus de biosynthèse, stockage et dégradation sont modulés par la génétique végétale et, conséquemment, par trois facteurs importants: le facteur héréditaire, le facteur ontogénique et le facteur environnemental (Seigler, 2002).

Pour ajouter à la complexité des routes métaboliques, la classification des métabolites secondaires peut aussi prêter à confusion. Les métabolites secondaires peuvent être classifiés en prenant comme base soit leur structure chimique (par exemple, la présence d'anneaux ou sucre), soit leur composition (contenant ou non de l'azote), leur solubilité dans divers solvants ou encore la voie par laquelle ils sont synthétisés (ex.: dérivé de l'acétate par la voie de l'acide citrique). Une simple classification peut comprendre trois groupes principaux: les terpènes et stéroïdes, les polyphénols et les alcaloïdes (Simões et al., 1999) (figure 1.20).

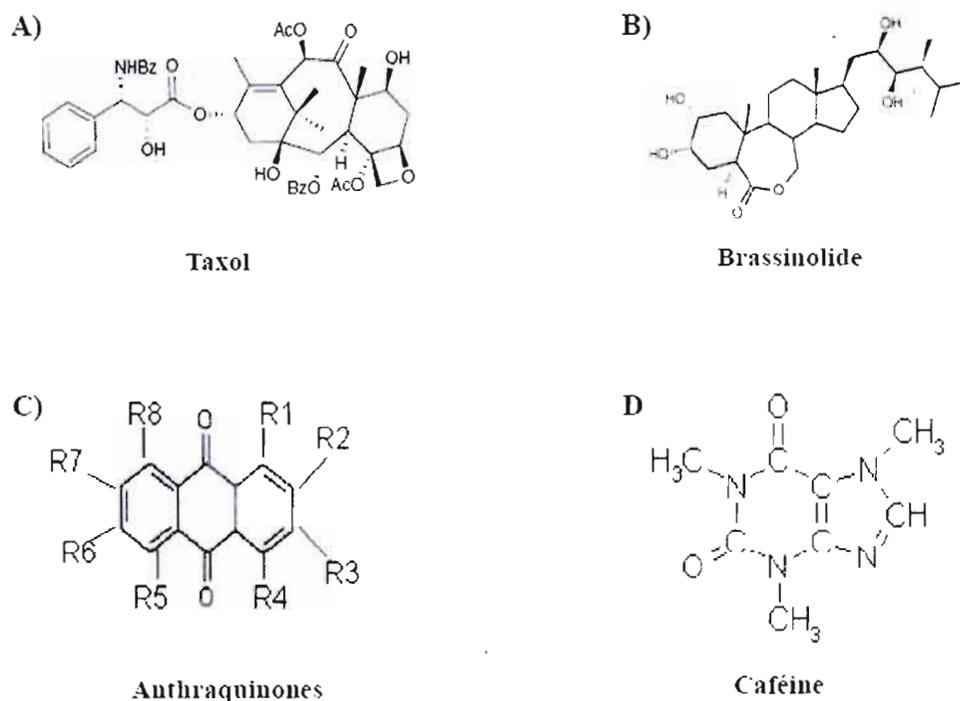


Figure 1.20 Exemples de substances d'origine végétale. Ces substances peuvent être classifiées en trois groupes principaux selon leur caractéristique structurale: les terpènes et stéroïdes (A et B), les polyphénols (C) et les alcaloïdes (D). (Adaptée de Simões et al., 1999.)

1.2.1. Les terpènes et stéroïdes

Les terpènes sont des dérivés de l'isoprène (C_5H_8 ; *isopentenyl diphosphate*, IPP) (figure 1.21), qui est formé à partir de la voie de l'acide mévalonique, et qui ont pour formule de base des multiples de l'IPP, c'est-à-dire $(C_5H_8)_n$ (ex.: $n=2$, $C_{10}H_{16}$ monoterpène; $n=3$ $C_{15}H_{24}$ sesquiterpènes, $n=6$ $C_{30}H_{48}$ triterpènes, etc.) (Santos, 1999).

Plus de 20 000 dérivés des terpènes ont été caractérisés et, à chaque année, on en caractérise une centaine d'autres. Les terpènes sont bien connus pour leur utilisation dans les fragrances, les aromatisants et comme agents insecticides. De plus, ces molécules très

diversifiées sont de grande importance pour les végétaux comme pigment, hormones reproductives et agents de défense (Sacchetti et Poulter, 1997; Tholl, 2006).

Les stéroïdes sont des métabolites dont la structure se compare à celle des triterpénoïdes. Une grande variété de ces substances est produite par les plantes et selon Dinan et al. (2001), les stéroïdes peuvent être regroupés en trois catégories principales: 1) phéromones végétales (ex.: brassinostéroïdes); 2) substances allélochimiques homologues aux hormones trouvées chez les animaux vertébrés (ex.: androgènes, œstrogènes, progestagènes, corticoïdes et cholécalférol); 3) substances allélochimiques ayant une action répulsive ou toxique spécifique aux plantes (ex.: cucurbitacines, cardénolides, etc.).

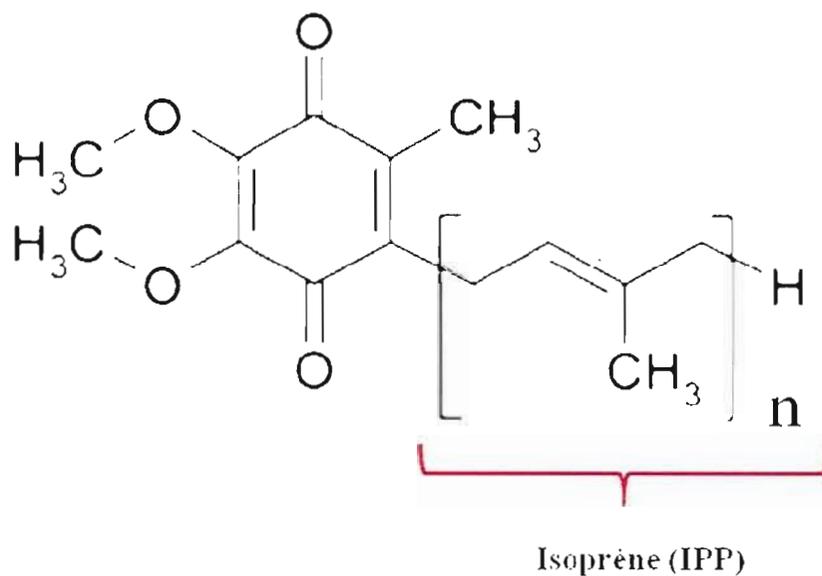


Figure 1.21 L'isoprène (IPP) constitue la base de formation des terpènes et stéroïdes. (Tiré de Simões et al., 1999.)

1.2.2. Les composés phénoliques ou polyphénols

Les composés phénoliques, d'un grand intérêt pour les chercheurs, sont les substances les plus recherchées par l'industrie. Les principales raisons de cette popularité sont leur propriété antioxydante, leur abondance dans les aliments et leur rôle probable dans la prévention de plusieurs maladies associées au stress oxydatif, telles que le cancer et les maladies cardiovasculaires et dégénératives (Middleton et al., 2000).

Les composés phénoliques sont des molécules contenant plusieurs groupes hydroxyles dans un benzène (voir figure 1.20C) de sorte qu'ils peuvent être classifiés en différents groupements en fonction du nombre de benzènes et des structures qui lient ces benzènes. Quatre groupes (eux-mêmes formés de sous-groupes) sont connus: les acides phénoliques (sous-groupes: phénols simples, acides-phénols dérivés de l'acide benzoïque ou cinnamique), les flavonoïdes (sous-groupes: isoflavonoïdes et anthocyanes), les stilbenes et les lignanes (sous-groupes: lignanes, lignines, tanins condensés) (Manach et al., 2004).

1.2.3. Alcaloïdes

Les alcaloïdes (de l'arabe *al-qali*=nom de la plante d'où le soda a été isolé) constituent un groupe d'une diversité structurelle remarquable. Depuis le premier alcaloïde isolé, la morphine, en 1806 par Sertürner, plus de 12 000 alcaloïdes ont été décrits et environ 20% des plantes accumulent ces substances (De Luca et St. Pierre, 2000).

Les alcaloïdes sont des composés azotés (voir figure 1.20D) de faible poids moléculaire dérivés du métabolisme des acides aminés comme la phénylalanine, la tyrosine, le tryptophane, la lysine et l'ornitine (Kutchan, 1995).

Dans la nature, on croit que les alcaloïdes servent à stocker l'azote, réguler la croissance et le métabolisme interne végétaux, désintoxiquer et transformer les substances nocives au végétal, ainsi qu'à protéger contre les rayons ultraviolets (Henriques et al. 1999). Comme produits utiles à l'homme, les alcaloïdes sont soit extraits des plantes, purifiés et

utilisés sous forme thérapeutique (morphine, codéine, vincristine, vinblastine) soit simplement présents dans les aliments (caféine et théine) (Kutchan, 1995; Henriques et al. 1999).

1.3. Les plantes médicinales et le système cellulaire des mammifères

Ainsi que nous l'avons vu, la diversité des substances d'origine végétale contribue à la complexité de la définition des mécanismes d'action des plantes médicinales et rend difficile la tâche d'établir leur innocuité. Ces deux facteurs sont liés aux caractéristiques propres des plantes, à l'interaction de ces produits avec d'autres produits d'origine synthétique et à la capacité d'interaction encore peu connue entre les produits végétaux et les cellules des mammifères (Firenzuoli et Gori, 2007).

Le « black box » des traitements à base de plantes est caractérisé par l'absence d'une information complète et définie relativement à la composition des extraits. Les extraits des plantes peuvent présenter une variabilité de composition chimique qui dépend de plusieurs facteurs comme de l'espèce botanique, de la partie de la plante utilisée (feuille, racine, fleur, graine, etc.), du moment et du lieu de la collecte, des conditions de stockage (présence de lumière, humidité, etc.) ainsi que du type de sol (Figueiredo et al., 1986; Silva, 1998; Firenzuoli et Gori, 2007).

Aussi, il est connu que les plantes médicinales peuvent être utilisées concomitamment avec des produits pharmaceutiques synthétiques (Izzo et Ernest, 2001; Izzo et al., 2006). Certaines plantes réduisent ou augmentent la concentration plasmatique des médicaments par l'induction ou l'inhibition d'enzymes ou de transporteurs cellulaires. SJW (millepertuis), par exemple, altère la biodisponibilité de certaines substances comme la digoxine ou les contraceptifs oraux à travers l'induction ou l'inhibition de l'expression de l'enzyme cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) (Markowitz et DeVane, 2001; Henderson et al., 2002; Komoroski et al., 2004). À l'instar du SJW, l'échinacea, l'ail, le ginko biloba et le chardon-Marie (*milk thistle*) diminuent la biodisponibilité des substrats de la glycoprotéine-P

(P-gp) par une diminution de l'expression de ce transporteur cellulaire (Perloff et al., 2001; van den Bout-van den Beukel et al., 2006).

Une autre restriction concernant l'utilisation des plantes médicinales est la possibilité de causer des effets indésirables. Par exemple, les glucosides salicyliques et les sesquiterpènes sont fréquemment à l'origine de processus allergiques (Hausen et Osmundsen, 1983) et les alcaloïdes pyrrolizidines peuvent provoquer le cancer (Kovach et al., 1979; Mei et al., 2005).

L'objet de notre recherche étant l'utilisation des extraits des plantes pendant la grossesse, nous avons pris connaissance de plusieurs études menées auprès de communautés qui démontrent une importante utilisation des plantes médicinales par les femmes enceintes (Glover et al., 2003; Marcus et Snodgrass, 2005; Refuerzo et al., 2005; Oliveira et al., 2006; Holst et al., 2008; Zhang et al., 2008; Moussally et al., 2009). Dans le cas de plusieurs de ces plantes, l'innocuité n'a pas été démontrée, pas plus que n'a été scientifiquement validé l'effet pour lequel elles sont consommées. Le tableau 1.1, montre quelques exemples de plantes médicinales consommées pendant la grossesse (ou dans la période pré-grossesse) et les évidences scientifiques reliées aux effets de ces plantes.

Bien que les produits d'origine végétale présentent une structure chimique complexe et proviennent de chemins métaboliques différents de ceux des métabolismes humains, les nombreux rapports de littérature démontrent que ces produits, sous la forme d'extrait brut ou de substance isolée, peuvent interférer avec les processus cellulaires propres aux mammifères (tableau 1.2. et 1.3.). La plupart des études démontrent l'effet des produits végétaux sur le système cellulaire dans les modèles *in vitro*; cependant, les modèles *in vivo* et la détermination de la présence de certaines substances comme l'hypericine dans le plasma humain (Riedel et al., 2004; Gioti et al., 2005) démontrent leur capacité d'atteindre la circulation sanguine et, par conséquent, les divers tissus du corps humain. Étant un organe en contact intime avec le sang maternel, le placenta humain pourra être sensible à l'action des substances d'origine végétale. Ces produits peuvent donc affecter le développement placentaire ou les échanges materno-fœtaux.

Tableau 1.1 Exemples de plantes médicinales utilisées pendant la grossesse ou durant la période précédant immédiatement la grossesse, avec leur usage dans la médecine traditionnelle et l'action cellulaire et/ou clinique de leur efficacité

Plantes médicinales	Usage traditionnel	Action cellulaire/clinique	Références
Agneau chaste (<i>Vitex agnus-agnus</i>)	Problème gynécologique (syndrome prémenstruel, mastalgie cyclique, irrégularité menstruelle)	Liaison aux récepteurs d'estrogène dans le cœur, les vaisseaux, les os et la vessie Action sur les récepteurs d'acétylcholine, récepteurs dopaminergique et opioïde	Wuttke et al., 2003 Firenzuoli et Gori, 2007 Dugoua et al., 2006
Ail (<i>Allium sativum</i> L.)	État grippal, diarrhée, abortif, antiparasitaire, antihypertensif, antithrombotique	Action anti-agrégation plaquettaire Action hypolipidémique Action comme hypotenseur	Refuerzo et al., 2005 Firenzuoli et Gori, 2007 Holst et al., 2008 Moussaly et al., 2009
Echinaceae (<i>Echinaceae purpura</i>) seule ou combinée	Traitement du virus de l'herpès Traitement des infections urinaires et des mycoses (infections vaginales à <i>Candida</i> récidivantes) Traitement des infections cutanées (acné, furoncles, piqûres, etc.)	Diminution de la durée d'un rhume et prévention, chez une personne déjà enrhumée, du développement d'une infection respiratoire secondaire comme une pneumonie Stimulation des défenses immunitaires	Skalski, 2004 Holst et al., 2008 Moussaly et al., 2009 Ricquart, 2010

Tableau 1.1 (Suite...)

Plantes médicinales	Usage traditionnel	Action cellulaire/clinique	Références
Ginseng (<i>Panax ginseng</i>)	Stimulant	Action contre le diabète Effet sur le NO Effet neuropharmacologique lié à la maladie de Parkinson Augmentation du potentiel de réaction du système immunitaire	Refuerzo et al., 2005 Firenzuoli et Gori, 2007 Holst et al., 2008 Jia et al., 2009 Moussaly et al., 2009
Gingembre (<i>Zingiber officinalis</i>)	Laxatif; contre la nausée du matin	Agoniste cholinergique (effet sur le récepteurs post-synaptiques M3) Inhibition des autorécepteurs muscariniques	Glover et al., 2003 Refuerzo et al., 2005 Ghayur et al., 2007 Holst et al., 2008 Moussaly et al., 2009
Ginkgo biloba (<i>Ginkgo biloba</i>)	Circulation; contre les problèmes cognitifs	Augmentation des fonctions neurocognitives chez les adultes sains	Mix et Crews, 2000 Refuerzo et al., 2005 Bent et al., 2005 Elsabagh et al., 2005 Firenzuoli et Gori, 2007 Holst et al., 2008

Tableau 1.1 (Suite...)

Plantes médicinales	Usage traditionnel	Action cellulaire/clinique	Références
Jenipapo (<i>Genipa americana</i>)	Teinture pour le corps, aphrodisiaque, comestible, anti-hypertensif, anti-syphilis; contre l'anémie, l'ictère, l'asthme, les problèmes de foie et de rate	Activité antitumorale des iridoïdes <i>in vitro</i>	Ueda et al., 1991 Robineau, 1995 Mors, 2000 Moreira et al., 2002 Lorenzi et Matos, 2002
Menthe poivrée (<i>Mentha piperita</i>)	Panacée	Antioxydant et antitumoral, anti-allergénique, antimicrobienne	Glover et al., 2003 McKay et Blumberg, 2006 Moussaly et al., 2009
Millepertuis (<i>Hypericum perforatum</i>)	Guérison des blessures; contre la dépression modérée	Inhibition de la monoaminoxidase Induction de l'expression de CYP3A4 Diminution de l'influx des neurotransmetteurs	Suzuki et al., 1984 Wagner et al., 1999 Roz et Rehavi, 2003 Glover et al., 2003 Firenzuoli et Gori, 2007 Holst et al., 2008 Moussaly et al., 2009

Tableau 1.1 (Suite...)

Plantes médicinales	Usage traditionnel	Action cellulaire/clinique	Références
Thé (<i>Camellia sinensis</i>)	vert Régime amincissant, source d'antioxydant pour le maintien d'une bonne santé; contre œdème et rétention d'eau	Antioxydant (épigallocatechine) Action anti-inflammatoire et antiproliférative Anti-obésité	Glover et al., 2003 Syed et al., 2007 Canada, 2008 Moussaly et al., 2009 Grove et Lambert, 2010
Valerian (<i>Valeriana officinalis</i>)	Relaxation; contre l'insomnie	Amélioration de la qualité du sommeil Propriétés neuropharmacologiques sur le comportement et la convulsion	Leathwood et Chauffard, 1985 Lindahl et Lindwall, 1989 Hiller et Zetler, 1998 Holst et al., 2008

Note: CYP3A4: Cytochrome P₄₅₀ 3A4; NO: *nitric oxide*.

Tableau 1.2 Exemples de mécanismes d'action d'extraits de plantes médicinales dans les systèmes cellulaires des mammifères

Plantes	Mécanismes d'action	Références
<i>Acacia nilotica</i>	Inhibition de l'agrégation plaquettaire à travers le blocage des canaux de Ca^{2+} et probablement via PKC	Shah et al., 1997
<i>Hernandia nymphaeifolia</i>	Augmentation de l'influx de Ca^{2+} par les cellules rénales Action sur la signalisation du Ca^{2+} dans les neutrophiles	Chao et al., 2002
<i>Hibiscus sabdariffa L.</i>	Inhibition de l'expression des facteurs de transcription adipogénique comme FBP α et PPAR γ via PI3 kinase et MAPK → perte de la graisse corporelle	Kim et al., 2007
<i>Hypericum perforatum</i>	Activation du SXR Induction de l'expression de CYP3A4 Modulation des canaux de Ca^{2+} type P	Wentworth et al., 2000 Kristhal et al., 2001
<i>Lippia alva</i>	Inhibition des récepteurs de cytokine CCR5 Inhibition de la voie de signalisation dépendant de Ca^{2+}	Hedge et al., 2004

Note: CYP3A4: Cytochrome P₄₅₀ 3A4; CCR5: C-C chemokine receptor type 5; FBP α : fructose-1,6-bisphosphate alpha; MAPK: mitogen activated protein kinase; PKC: protéine kinase C; PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptors; SXR: steroid X receptor.

Tableau 1.3 Exemples de mécanismes d'action des métabolites isolés à partir de plantes médicinales dans les systèmes cellulaires des mammifères

Substances isolées	Plantes	Mécanismes d'action	Références
Acide oléanolique	Plusieurs plantes	Activation des voies en amont à Cox-2, libération de PGI ₂ → homéostasie vasculaire	Martinez-Gonzales et al., 2008
		Induction de l'agrégation plaquettaire modulée par la PLC et mobilisation intracellulaire du Ca ²⁺	Lee et al., 2007
Acide rosmarinique (RoSA)	Plantes de la famille des Lamiacées comme le romarin (<i>Rosemary</i>), le basilic (<i>sweet basil</i>) et le shiso (<i>perille</i>)	Inhibition de l'activation de la voie de PLCγ1-IP3-Ca ²⁺ -NFAT	Al-Sereiti et al., 1999 Kang et al., 2003
		Blocage de l'activation du Complément	Sahu et al., 1999 Kimura et al., 1987
		Inhibition des lipo-oxygénases et cyclo-oxygénases	Kelm et al., 2000
		Inhibition de la prolifération via la voie de MAPK	Xavier et al., 2009a
Acide ursolinique	Plusieurs plantes	Inhibition de l'activation de NFκB par suppression d'IκBα et phosphorylation de p65 → action anti-cancer	Shishodia et al., 2003
		Inhibition de la voie d'activation de STAT3 → diminue la prolifération des cellules tumorales humaines et induit l'apoptose	Pathak et al., 2007
Flavonoïdes	<i>Hypericum perforatum</i>	Action antidépressive <i>in vivo</i> (modèle de comportement chez le rat)	Butterweck et al., 2003

Tableau 1.3 (Suite...)

Substances isolées	Plantes	Mécanismes d'action	Références
Hyperforine	<i>Hypericum perforatum</i>	Régulation du courant de Ca ²⁺ par les canaux type P dans les neurones → anti-dépression	Fisunov et al., 2000
Hypericine	<i>Hypericum perforatum</i>	Inhibition de l'influx du Ca ²⁺ et ↓ la [Ca ²⁺] _i Inhibition de la PKC Augmentation de l'expression d'hème-oxygénase 1 à travers la voie de p38 et PI3K	Gao et Ge, 2005 Takahashi et al., 1989 Kocanova et al., 2007
Magnesium lithospermate B (MLB)	<i>Radix salviae miltiorrhizae</i>	Protection contre l'hypoxie des cellules endothéliales par l'inhibition de l'influx du Ca ²⁺ et régulation négative de l'expression génomique (ARNm) d'eNOS et d'iNOS.	Luo et al., 2002
Phytoestrogènes	Plusieurs plantes	Inhibition de la prolifération et production de progesterone par les trophoblastes	Plessow et al., 2003
Polyphénols	<i>Camellia sinensis</i>	Augmentation de l'exocytose	Pan et al., 2002

Note: eNOS: *endothelial nitric oxide synthase*; iNOS: *inducible NO synthase*; IP3: *inositol phosphate 3*; MAPK: *mitogen activated protein kinase*; NFAT: *nuclear factor of activated T cells*; PI3K: *Phosphoinositide 3-kinases*; PGI₂: *prostaglandine I 2*; PKC: *protein kinase C*; PLCγ: *phospholypase C gamma*; STAT3: *Signal transducer and activator of transcription 3*.

1.4. Les cellules *trophoblast-like* comme modèles *in vitro* pour le placenta

On observe une forte et croissante tendance à la consommation des produits chimiques, d'origine naturelle ou pharmaceutique, par les femmes enceintes (Bonati et al., 1990; Sabo et al., 2001; Dugoua et al., 2006; De Boer et Lamxay, 2009; Moussally et al., 2009) même si on ne peut en garantir l'innocuité pour le fœtus puisqu'il est impossible, pour des raisons éthiques évidentes, de mener ce genre d'expérimentation chez l'humain. Néanmoins, l'investigation pharmacologique est essentielle pour toutes les drogues afin de comprendre leurs processus métaboliques et devrait constituer un pré-requis nécessaire à leur usage (Kovo et Golan, 2008).

Afin de conduire pareille étude, les modèles animaux et placentaires humains sont largement utilisés. Le modèle murin, par exemple, en permettant l'expression transgénique des gènes cibles, contribue grandement aux études de la formation et de la physiologie du placenta *in vivo*. Cependant, ce modèle comporte un point faible en ceci qu'il n'est pas très performant pour l'étude de certaines pathologies comme la prééclampsie et la restriction de la croissance fœtale à cause des différences existantes au moment de l'implantation ou des différences anatomiques du placenta (Watson et Cross, 2005; Carter, 2007). Les modèles placentaires humains, quant à eux, sont utilisés pour étudier le transfert transplacentaire ainsi que le potentiel des substances à induire la tératogénie et la toxicité (Van der Aa et al., 1995; Liu et al., 1997; Lafond et al. 2004, Myllynen et al., 2005a,b; Whittley, 2006; Carter 2007; LeBellego et al., 2009).

Un des modèles placentaires les plus utilisés est le modèle de cellules de lignée d'origine trophoblastique (*trophoblast-like cells*). Ces cellules secrètent des hormones placentaires comme la gonadotropine chorionique humaine (hCG), le lactogène placentaire (hPL) et les hormones stéroïdiennes. De plus, certaines de ces cellules sont capables de se différencier quand des précurseurs des hormones sont ajoutés au milieu de culture, permettant par cette différenciation d'étudier la physiologie du placenta (Pattillo et al., 1968a,b; 1979; Taylor et al., 1991; Yashwanth et al., 2006; Prouillac et al., 2009).

Les premiers types de cellules trophoblastiques endocrines humaines à être cultivées *in vitro* ont été les cellules BeWo. L'origine de ces cellules remonte à 1959 lorsque le Dr R. Hertz a inoculé la tumeur placentaire humaine (choriocarcinome) à des hamsters afin de produire des tumeurs. Ces tumeurs ont été maintenues durant plusieurs années, par passages multiples entre animaux, jusqu'au développement de trois souches différentes. Une de ces souches a servi de source pour les cellules de lignée qui ont ensuite été mises en contact (co-culture) avec les explants de la membrane déciduale humaine. C'est à partir de cette co-culture que les cellules BeWo ont été établies (Hertz, 1959; Pattillo et Gey, 1968; Wolfe, 2006). À la même époque, Pattillo et collègues (1968b) ont aussi établi une deuxième lignée de cellules, les cellules JAR (Jar ou JAr), qui provenaient directement de la tumeur trophoblastique du placenta et qui possédaient aussi les caractéristiques morphologiques et hormonales du trophoblaste humain (Pattillo et al., 1968b, 1972, 1979).

Ensuite, les souches de BeWo isolées par Pattillo et collègues (1968b) ont été utilisées par Kohler et collègues (1971) afin de produire six clones de cellules dénommées JEG-1, -2, -3, -4, -7 et -8. Ces clones avaient les mêmes caractéristiques morphologiques et de production d'hormones que les cellules BeWo. Cependant, elles n'étaient pas capables de former les syncytia. De plus, les différentes lignées de JEG formées démontraient un taux varié de production d'hormones hCG et de progestérones. Aujourd'hui, la souche de JEG la plus utilisée et commercialisée par l'*American Tissue Culture Collection* (ATCC®) est la souche JEG-3.

Tout au long des dernières années, les cellules de lignée BeWo, JEG-3 et JAR ont été adaptées aux conditions des milieux de culture standards et sont aujourd'hui considérées comme des cellules de grande importance pour l'étude de la différenciation et de la fonction trophoblastiques (Fisher et al., 1989; Ushigome et al., 2000; Kudo et al., 2003; Sullivan, 2004; Wolfe, 2006; Dalton et al., 2007). Les avantages reconnus de ces cellules sont leur homogénéité, leur culture *in vitro* aisée et leur facilité à être clonées (Sullivan, 2004; Kovo et Golan, 2008).

En général, ces cellules se comportent de façon semblable; toutefois, quelques études ont démontré que leur réponse à certains stimuli présente des caractéristiques propres à chacune. Or, ces caractéristiques jouent un rôle très important dans l'utilisation de ces cellules comme modèles pour les trophoblastes. Les cellules *fusigéniques*¹ BeWo, par exemple, se prêtent mieux aux études de la différenciation cellulaire que les cellules *non-fusigéniques*¹ JEG-3 (Bahn et al., 1981; Taylor et al., 1997). Ces caractéristiques doivent être prises en considération au moment de choisir le modèle cellulaire le mieux adapté aux objectifs d'étude.

Récemment, deux études ont bien confirmé ces différences. Al-Nasiry et al. en 2006 ont prouvé que la détermination de la réponse cellulaire aux différents stimuli est fortement reliée à la capacité de fusion de ces cellules. Leurs résultats ont démontré que les cellules fusigéniques BeWo répondent différemment des cellules JEG-3 au stimulus d'inducteur de la différenciation (forskoline) ou de l'apoptose (TNF- α), en diminuant la prolifération et la viabilité cellulaire dans le cas de BeWo ou en produisant une forte induction de l'apoptose dans le cas de JEG-3. Puis, Pospeschova et al., 2009 ont montré qu'il y a une différence dans la régulation de l'expression du récepteur de vitamine D (VDR) entre ces deux types cellulaires et entre ces cellules et les trophoblastes primaires.

Compte tenu de l'interaction des produits d'origine végétale avec le système cellulaire des mammifères et du potentiel toxique de ces produits, l'utilisation des modèles expérimentaux du placenta peuvent être des outils intéressants pour la réalisation des études de prédiction préclinique des effets toxiques des plantes médicinales pendant la grossesse. C'est en partant de ce constat que la présente thèse vise à caractériser les effets de *Hypericum perforatum* (SJW), *Genipa americana* et *Lantana macrophylla* sur les processus cellulaires reliés à la formation et la fonction du placenta.

¹ Adapté de l'anglais: fusigenic et non-fusigenic. Dans les pages que suivent, les mots *fusigénique* et *non-fusigénique* seront utilisés sans caractère italique.

CHAPITRE 2

PREMIER ARTICLE

Avant-propos

“Effect of St. John’s wort standardized extract and hypericin on *in vitro* placental calcium transport” par Aline Oliveira da Conceição, Larissa Takser et Julie Lafond.

Hypericum perforatum L., ou Millepertuis ou St. John’s Wort (SJW), est une plante médicinale utilisée contre la dépression modérée. La mise en marché de cette plante requiert la normalisation de l’extrait brut pour un de ses composés, l’hypericine. En nous basant sur les rapports de la littérature indiquant d’une part les interactions entre les composants présents dans SJW et les structures cellulaires (protéine et génome) et d’autre part la toxicité de l’hypericine associée au transport du Ca^{2+} , nous avons émis l’hypothèse que SJW peut affecter le transport du Ca^{2+} par les cellules trophoblastiques et que cet effet peut être relié à la présence de l’hypericine. Ainsi, dans ce premier article, nous avons proposé de vérifier l’effet d’extrait de SJW et de l’hypericine sur le transport du Ca^{2+} par les cellules trophoblastiques-*like* humaines. Tout d’abord, en utilisant les cellules JEG-3 comme modèle *in vitro*, nous avons vérifié l’effet de l’extrait sur la viabilité cellulaire et la production de l’hormone hCG. Ensuite, en observant l’influx du Ca^{2+} et l’expression des transporteurs de cet ion, nous avons pu vérifier l’effet de l’extrait de SJW sur le transport de Ca^{2+} et le comparer à celui de l’hypericine.

J’ai réalisé tous les aspects de ce travail, à savoir le design expérimental, les travaux de laboratoire, l’analyse des données, la conception des figures et la rédaction de l’article. Je

suis redevable aux Dr Julie Lafond et Dr Larissa Takser pour l'aide qu'elles m'ont apportée dans la conception des figures et dans l'analyse critique de l'article.

Cet article a été accepté pour publication par le *Journal of Medicinal Food*.

Effect of St. John's wort standardized extract and hypericin on *in vitro* placental calcium transport

Running title: Effect of St. John's wort and hypericin ...

Aline Oliveira da Conceição^{1,2,3}, Larissa Takser⁴, Julie Lafond^{1,2,3}

Affiliation

¹*Laboratoire de Physiologie Materno-foetale, Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada*

²*Centre de recherche BioMed, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada*

³*Institut Santé-Société, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada*

⁴*Département Obstétrique Gynécologie, Faculté de Médecine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada.*

Correspondence :

Prof. Julie Lafond, Centre de Recherches Biomédicales – Département de Sciences Biologiques. Université du Québec à Montréal C.P. 8888, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8

E-mail: lafond.julie@uqam.ca Fax: +1 514 987 67 63

2.1. Abstract

Hypericum perforatum L., known as St. John's Wort (SJW), is widely used in human therapeutics for wound healing and to treat depression, however its recommendation during pregnancy is controversial. Hypericin, a polycyclic quinone isolated from this plant, has been studied and used to standardize the plant extracts. The objective of the present study was to examine the effect of SJW and hypericin on *in vitro* placental Ca^{2+} transport. Cell viability, human chorionic gonadotrophin (hCG) production, Ca^{2+} uptake, and Ca^{2+} transport proteins expression analysis were conducted using JEG-3 cell line. Toxicity of SJW was seen at high concentrations ($\geq 150 \mu\text{g/mL}$) but no effect on hCG production was observed using SJW (25 $\mu\text{g/mL}$) or hypericin (7.5 and 75 ng/mL). The results showed that cells treated with both SJW and hypericin increased intracellular Ca^{2+} concentration after long time (24 h) but not short time (10 min) period incubation. A significant decrease in translationally controlled tumor protein (TCTP) Ca^{2+} handling protein only was seen with SJW treated cells. Hypericin increased the transient-receptor potential - vanilloid (TRPV) 6 Ca^{2+} channel and calcium-binding protein – 28 KDa (CaBP28) protein expression and decreased the plasma membrane Ca^{2+} ATPase (PMCA) 1/4 protein expression. In conclusion, SJW and hypericin can increase the trophoblast internal Ca^{2+} concentration through regulating the protein expression of Ca^{2+} transport system and their intake during pregnancy is still a point of concern.

Keywords: Ca^{2+} uptake; calcium-binding protein – 28 KDa (CaBP28); JEG-3 cells; *Hypericum perforatum*; Hypericaceae; plasma membrane Ca^{2+} ATPase (PMCA)1/4; transient-receptor potential - vanilloid (TRPV) 6; translationally controlled tumor protein (TCTP).

2.2. Introduction

Hypericum perforatum L., known as St. John's Wort (SJW), is widely used in human therapeutics for wound healing (Vogel, 1970; Miller, 1998; Oztürk et al., 2007) and to treat mild to moderate depression (Miller, 1998; Wurglics and Schubert-Zsilavecz, 2006). Its use during pregnancy is controversial. Even if it is recommended by some physicians to pregnant women, its safety during pregnancy and lactation is not well established (Einarson et al., 2000; Dugoua et al., 2006).

Hypericin and hyperforin, polycyclic quinone and phoroglucinol derivatives respectively, are the most studied substances from this plant (Wurglics and Schubert-Zsilavecz, 2006). Hypericin is known for its medicinal properties such as antiviral (Kraus et al., 1990) and anticancer activities (Diwu, 1995; Kocanova et al., 2007). However its toxic effects such as photosensibilizing (Schempp et al., 2000) and photocytotoxicity associated to Ca^{2+} mobilization from cell internal stores (Theodossis, 2006) has limited its usage alone in therapy. Although the antidepressive effect of SJW was proved to be due to several compounds (Butterweck, 2003; Butterweck et al., 2003), hypericin is still used to standardize commercial SJW preparations (Shah, 2005).

During pregnancy, several mechanisms account for substance transfer across the placenta. First, through human placentation, the formation of a hemomonolayer of trophoblast cells occurs forming a physical barrier between maternal and fetal circulations. Second, this barrier allows an intimate contact, via only one layer of syncytiotrophoblast, between embryo and nutrients but not a direct contact between mother and foetus (Leiser and Kaufmann, 1994; Malassine, 2001). The hemomonolayer formation includes a differentiation of trophoblast cells into syncytiotrophoblast and this process involves morphological and biochemical changes. Morphological differentiation of cytotrophoblasts in syncytiotrophoblast is defined by the fusion of mononucleated cytotrophoblast cells with adjacent syncytium forming a polynucleated structure (Midgley et al., 1963), and the biochemical differentiation includes the production of hormones such as human chorionic

gonadotrophin (hCG) and human placental lactogen (hPL) (Kliman et al., 1986; Morrish, 1987).

The main functions of syncytiotrophoblasts are absorption, exchanges and specific hormonal secretion (Jansson and Powell, 2006; Lafond and Simoneau, 2006). One of the most important exchanges is the Ca^{2+} transport, required by the fetus for skeletal formation, neuromuscular activities, and coagulation (Hershberger and Tuan, 1998). Syncytiotrophoblasts are the primary site of fetal Ca^{2+} homeostasis regulation which includes mechanisms characterized by Ca^{2+} entry, cytosolic diffusion and extrusion (Belkacemi et al., 2005a). First, Ca^{2+} can enter either through tight junctions located between epithelial cells or specialized Ca^{2+} channels (Hoenderop et al., 2005). The epithelial channels constitute the rate-limiting influx step on active Ca^{2+} absorption (Hoenderop et al., 2001) being voltage-dependent Ca^{2+} channels (VDCC) and stored-operated Ca^{2+} channels (SOC), the most important in human placenta (Lafond and Simoneau, 2006). SOC channels are represented in the placenta cells by the transient-receptor potential (TRP) family including TRPV5 and TRPV6, which are highly Ca^{2+} -selective channels (Hoenderop et al., 2001; Moreau et al., 2002a). Secondly, cytosolic diffusion by Ca^{2+} -binding proteins (CaBPs) play an important role in regulating or shuttling Ca^{2+} in intracellular medium (Lafond and Simoneau, 2006). In placenta, the active Ca^{2+} transport across epithelia seems to be correlated to CaBP-9K and CaBP-28K (Nikitenko et al., 1998; Belkacemi et al., 2005b) and, more recently, to the translationally controlled tumor protein (known as TCTP or TPT1) (Arcuri et al., 2005). Finally, during pregnancy, fetal blood Ca^{2+} concentration is higher than maternal concentration, resulting in a maternal-fetal Ca^{2+} gradient that is maintained by the presence of several components such as pumps located in plasma membrane cell such as plasma membrane Ca^{2+} ATPase (PMCA) and to a lesser extent by $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX) (Belkacemi et al., 2005a).

Herbal medicines are the basis of health care worldwide and their use during pregnancy is a cause of concern (Marcus and Snodgrass, 2005). The toxicity of one or several substances present in extract preparations is not well known but the interference of plant

compounds on Ca^{2+} transport in rat myometrium (Reyes-Chilpa et al., 2004) and gene/protein expression in human umbilical vein endothelial cells is already reported (Luo et al., 2002). In relation to SJW, it was reported the interaction between its compounds and G protein-coupled receptors (GPCRs), transporters, ion channels (Butterweck et al., 2002), and cell DNA (Miskovsky et al., 1995). Especially, the SJW compound, hypericin, is an intriguing substance to study because: 1) there are literature reports that indicate its influence on calcium transport (Gao and Ge, 2005; Theodossis, 2006); 2) the isolated hypericin has been well studied for clinical usage (Kraus et al., 1990; Liu et al., 2000; Jacobson et al., 2001); and 3) it is the only substance used to standardize SJW extract with known amounts in it (Wurglics and Schubert-Zsilavecz, 2006). However, the interference of plant extract, such as SJW, or isolated substances related to these plants on trophoblast derived cells and its implication in pregnancy is poorly clarified. Therefore, in the present study, we evaluated the influence of SJW and hypericin on *in vitro* placental Ca^{2+} influx and transporters involved on it.

2.3. Material and Methods

2.3.1. Materials

A stock solution was made of 10 mg of a standardized *H. perforatum* powder extract (SJW; the standard extract was purchased from the market and each gelatin capsule contains 270 mg of 10:1 SJW extract standardized at 0.3% hypericin – Homeocan®, Canada; batch no. 05213). The contents of SJW capsules were combined and solubilized in 10 mL dimethyl sulfoxide (DMSO) and aliquots were frozen at -20°C . Purified hypericin ($\geq 85\%$ HPLC, CAS#548-04-9) was purchased from Sigma-Aldrich (Canada). Stock solution was made solubilizing 1 mg in 100% sterile DMSO. Immediately before use, the two stock solutions were diluted in modified Eagle medium (MEM-Gibco®) with 10% fetal calf serum (FCS) at specific concentrations and supplemented with 100 U/mL of penicillin G (Sigma-Aldrich, Canada) and 100 $\mu\text{g/mL}$ of streptomycin (Amresco® – Mandel Scientific Company Inc., Canada). To proceed with the biological tests, cells were treated with SJW (25-250 $\mu\text{g/mL}$), and hypericin at 7.5 ng/mL and 75 ng/mL . Hypericin concentrations were chosen based on

human plasma levels described in the literature (Wurglics and Schubert-Zsilavecz, 2006). Also, due to technique limitation, we chose only one non toxic SJW concentration. This concentration reflects the amount of hypericin found in the extract (0.3%) and is the same as the highest hypericin concentration used (75 ng/mL). While performing the tests, samples were protected from light. For all tests, control consisted of cells treated with DMSO at the lowest plant dilution which was less than 0.01% (v/v). Positive controls consisted of cells treated with forskolin (FKL, 50 μ M; \geq 98% HPLC, CAS#66575-29-9; Sigma-Aldrich, Canada), a cell-permeable diterpenoid that activates adenylyl cyclase and affects Ca^{2+} currents (Park and Kim, 1996; Dai et al., 2008) and ruthenium red (RuR) (1 to 1000 μ M; CAS#11103-72-3; Lot#71k1563; Sigma-Aldrich, Canada), an antagonist of intracellular Ca^{2+} release channels and putative blocker of voltage-gated Ca^{2+} channels in the cell surface membrane (Tapia and Velasco, 1997; Cibulsky and Sather, 1999).

2.3.2. Cell line and cell viability

The human placental choriocarcinoma cell line, JEG-3 (ATCC - HTB-36 Manassas, VA, USA) cells, was used to perform all the biological assays. Cells were maintained in MEM with 10% FCS supplemented with antibiotics as mentioned above and the densities of cells were 3×10^3 cells/well or 2.5×10^5 cells/well in 96 and 24 well plates respectively. After 24 h medium was changed and cells were incubated again for another 24 h. When cells reached 85-90% of confluence the different treatments were done. Cell viability was estimated by 3-(4, 5-di-metilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich, Canada) assay, after 48 h of treatment. For morphological evaluation, cells were washed twice with phosphate buffer saline (PBS), fixed in methanol at $-20^{\circ}C$ for 10 min, washed again with PBS (three times), and then incubated in PBS containing 2% FBS (v/v) for 45 min, to eliminate non-specific binding. Thereafter, cells were rinsed with PBS and incubated in the presence of mouse antihuman antidesmosomes monoclonal antibody (1/700) in PBS containing 0.2% BSA for 1 h at room temperature. After being washed three times with PBS, cells were incubated with Alexa Fluor 488 goat antimouse IgG (1/1000) for 1 h at room temperature in the dark. For nuclear staining, cells were incubated with propidium iodide (50

µg/mL) for an additional 30 min at room temperature in the dark, washed three times with PBS, and viewed using a Nikon Eclipse TE300 camera (Nikon, Tokyo, Japan) equipped with a confocal laser-scanning microscope (Bio-Rad MRC1024, CA, USA).

2.3.3. hCG production

The effect of SJW on cytotrophoblast differentiation was monitored by hCG release, a well-known marker of differentiation. For that, 2.5×10^5 cells/well were seeded in 24 well plates. After 24 h of treatment, the influence of plant extract on hCG production in the supernatant was measured using ELISA kit (DRG®, Germany) which includes the detection of the beta chain of the hCG molecule. For β -hCG dosage, 5 fold diluted samples were used following manufacturer's specifications.

2.3.4. Ca²⁺ uptake

In order to evaluate the total cell Ca²⁺ incorporation, radiolabeled Ca²⁺ (⁴⁵CaCl₂, ICN Biochemicals - Irvine, CA, USA) was used in 2.5×10^5 cells/well seeded in 24 well plates. After 24 h of treatment with SJW (25 µg/mL), hypericin (7.5 and 75 ng/mL), FKL (50 µM), and DMSO only, the Ca²⁺ uptake was performed. For that, cells were incubated at 37°C for different intervals of time (0 to 20 min) with 250 µL of Hank's balanced salt solution (HBSS) buffer containing ⁴⁵CaCl₂ (5 µCi/well). The incubation was stopped and cells were washed three times with 1 mL of cold phosphate buffer saline (PBS) (4°C) containing 4 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA). Cells were then solubilized in 500 µL of 0.5 M NaOH, and ⁴⁵Ca²⁺ cell-associated radioactivity was measured by a β -scintillation 1.400TM counter (PerkinElmer Inc., USA). The cellular protein contents of each well were evaluated by spectrophotometric quantification using bicinchoninic acid protein assay (BCA) reagent (Pierce, Rockford, IL, USA) with bovine serum albumin (BSA) as standard. The curves were built using linear and non-linear regression analysis.

Also, in order to clarify the effect of SJW and hypericin on channels from the cell surface membrane, confluent JEG-3 cells cultures (48 h) were treated with HBSS containing

SJW (25 µg/mL), hypericin (7.5 and 75 ng/mL) and RuR (1, 10, 100 and 1000 µM) (Moreau et al., 2002) 10 min before performing Ca²⁺ uptake. Negative controls consisted of HBSS treated cells.

2.3.5. Effect of SJW and hypericin on Ca²⁺ transport proteins expression

After 24 h treatment, total protein and RNA were extracted. For protein detection, rabbit anti-histamine releasing factor (HRF)/TCTP IgG (23 KDa) (1:500 in TBS-T 1% BSA – Medical & Biological Laboratories, Japan), mouse anti-PMCA1/4 IgG (140 KDa) (1:1000 in TBS-T 5% BSA – Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz - CA, USA), anti-CaBP28K (1:500 in TBS-T 3% BSA, Abcam Inc., Cambridge, MA, USA) was used overnight at 4°C. Rabbit anti-TRPV-6 (1:500 in PBS 1% BSA and 1% powdered milk – Alomone Labs Ltd, Jerusalem, Israel) was used for 2 h. All Western blot reactions were followed by addition of horseradish peroxidase (HRP) anti-rabbit-IgG conjugated (1:2500 TBST-5% powdered milk, Cell Signaling, Chemicon, Temecula, CA, USA) or goat anti-mouse-IgG HRP-conjugated (1:5000 TBST-5% powdered milk, Chemicon, Temecula, CA, USA) for 1 h at 20–25°C as second antibodies. The membrane was detected using the enhanced chemiluminescence (ECL – Roche Applied Science, Laval, CA, USA) protocol. After stripping with 0.2 M glycine, 0.5 M NaCl, pH 2.5, the membrane was similarly stained with mouse anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH – 36 KDa, 1:5000 in TBST-5% BSA, Chemicon, Temecula, CA, USA) antibodies. Goat anti-mouse-IgG HRP-conjugated (1:10.000 in TBST-5% powdered milk, Chemicon, Temecula, CA, USA) was used as the second antibody. Quantification was carried out by digitizing the images with a computer-based image analysis system and measuring band intensities in grey-scale pixel values (Image J 1.38x, National Institutes of Health, USA). Western blot results were normalized to GAPDH expression.

2.3.6. mRNA expression quantification

To perform the analysis of mRNA expression, the total RNA were extracted using RNeasy mini-kit (Qiagen, Mississauga, Canada). Total RNA (1 µg) were reverse transcribed and the Real-time PCR reaction was performed using a Light Cycler System (Roche Science, Laval, CA). PCR were carried out with LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche

Science, Laval, CA) using 10 mM of each primer (TCTP sense 5'-TGTTCTCCGACATCTACAAGATCC-3';

anti-sense 5'-TTCTGTCCTACTGACCATCTTCC-3';

PMCA1 sense 5'-CAGCAGGAGAACCAGAACCA-3';

anti-sense 5'-ATTCCAGCCCTCTGACACTT-3';

PMCA4 sense 5'-TCAGGAATCCAACGGTG-3';

anti-sense 5'-TCGATGACAGTGCGTACC-3';

TRPV6 sense 5'-TCTGCGGACGGGAGTATGG-3';

anti-sense 5'-CCTGTGCGTAGCGTTGGA-3') (Operon Qiagen, Seattle, WA), and 1 μ L of cDNA samples in a total volume of 10 μ L. The ribosomal gene 18S (sense 5'-CGCCGCTAGAGGTGAAATTC-3'; anti-sense 5'-TTGGCAAATGCTTTCGCTC-3') was used as reference gene to quantify the expression of the target genes. The CaBP28K gene expression was not performed because in prior experiment we cannot obtained detectable amount of its mRNA (data not shown). The amplification conditions were: 5 minutes at 95°C, followed by 55 cycles with 5 s at 95°C and 10 s at 58-60°C and 10 s at 72°C. The relative quantification was done by the comparative method of relative quantification.

2.3.7. Statistical analysis

Student's *t* test and one-way ANOVA test followed by Tukey's test were done. Statistical analyses were performed with the Prism software (version 5.00; GraphPad Software, 2007, San Diego, California, USA).

2.4. Results and discussion

2.4.1. Effect of SJW on cell viability

In our study, putative clinical doses of SJW and hypericin were tested on the trophoblast cell line based on hypericin plasma concentration (Wurglics and Schubert-Zsilavecz, 2006) and percentage (0.3%) of hypericin used to prepare SJW standardized extracts (Shah, 2005). Due to its poor water solubility, hypericin presents a low bioavailability in human plasma and clinical studies showed that hypericin elimination half-life (6 to 48.2 h) and concentration in plasma (1.3 to 91 ng/mL) can vary widely (Wurglics and Schubert-Zsilavecz, 2006). A significant decrease on JEG-3 cell viability was seen with SJW at high concentrations (150 and 250 $\mu\text{g/mL}$) (figure 2.1A) and it was characterized by vacuolization, tumefaction, and cell death which confirm previous cytotoxic description for other *Hypericum* species using different cell lines (Schmitt et al., 2001; Ferraz et al., 2005). Also, it was noted that, even if 75 $\mu\text{g/mL}$ of SJW gave the higher percentage of cell viability by MTT technique, cell vacuolization with displaced nuclei and less confluence of cell monolayer were still observed by the microscopic analysis compared to control cells, which did not show any morphological alteration (figure 2.1B and C). In relation to the relative amount of hypericin (0.3%) present in 75 $\mu\text{g/mL}$ (225 ng/mL of hypericin) of commercial SJW, it could be affirmed that this dose does not reflect the maximal therapeutically amounts of hypericin found in human plasma (Wurglics and Schubert-Zsilavecz, 2006). However, there is lack of information concerning the relative concentration of other SJW compounds which suggests that a special attention should be given to SJW posology.

2.4.2. Effect of SJW and hypericin on trophoblast biochemical differentiation

The function of the human placenta is dependent upon the successful formation and expansion of syncytiotrophoblast. This layer expands through intercellular fusion with the underlying differentiating mononuclear villous cytotrophoblast, which includes decreased proliferative capacity and increased substances production. These substances characterize the biochemical differentiation of trophoblasts and include the production of hormones such as

human chorionic gonadotrophin (hCG) (Kliman et al., 1986; Malassine and Cronier, 2002). Thus, the influence of SJW and hypericin on JEG-3 cells hCG release was evaluated. Supernatant hormone dosages showed increased production of hCG by FKL stimulated cells (figure 2.2). However, no significant difference was observed between treated and control cells nor between each treatment. The induction of trophoblasts cells hCG production by FKL as a result of adenylyl cyclase activation has been clearly described in the literature (Cheng et al., 2000; Lanoix et al., 2006) and it is confirmed by our results. Thus, in comparison, our data indicate that SJW and hypericin do not affect placental differentiation and support the results obtained from oral administration of SJW to pregnant rats which did not show to interfere on organogenesis process (Borges et al., 2005).

2.4.3. Effect of SJW and hypericin on trophoblast Ca^{2+} transport

First, as a function of syncytiotrophoblast cells, Ca^{2+} uptake kinetics experiments were performed to evaluate the dose effect of SJW and hypericin after 24 h treatment. For that, the Ca^{2+} uptake kinetic comprehending 0 to 20 min was done in JEG-3 cell line as described before (Moreau et al., 2001; Moreau et al., 2002a). As expected, JEG-3 control cells exhibited active uptake of extra cellular Ca^{2+} under the specific experimental conditions, showing a near-linear kinetics for the first 5 min and the establishment of a plateau after 10 min of incubation with $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (figure 2.3B). FKL treated cells also demonstrated the likely effect with a significant increase in intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Overall, SJW and hypericin increased the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of JEG-3 cells. Interestingly, treating cells with SJW caused a significant increase in Ca^{2+} uptake at 2 min similar to FKL (figure 2.3A), which was not seen with hypericin. This tendency of intracellular Ca^{2+} retention at the linear phase by SJW may represent the influence of some other extract compounds such as hyperforin on membrane transporters like voltage-dependent Ca^{2+} channels (VDCC) or other ionic conductance pathways described in the literature (Muller et al., 2001).

Hypericin as well as SJW caused a significant increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ at 20 min of the kinetic curve compare to FKL levels (figure 2.3B). The intracellular Ca^{2+} retention in this phase depends on factors such as the binding of Ca^{2+} to intracellular proteins or its

sequestration in intracellular membrane compartments (Moreau et al., 2001), which suggests an effect of SJW and hypericin on Ca^{2+} recruitment from internal compartments through a CaBP pathway. Moreover, the subcellular localization into the cell nucleus (Miskovsky et al., 1995) and its effect on internal Ca^{2+} mobilization through targeting mitochondrial aconitase (Theodossis, 2006) or altering $[\text{Ca}^{2+}]_i$ influx pathway already seen in retinal model (Gao and Ge, 2005) support this idea. Hence, the intracellular accumulation of Ca^{2+} by both treatments suggests that hypericin is an important toxic compound present in SJW. However, as seen for the antidepressive activity (Butterweck, 2003), the different toxic effect of SJW may be related to a synergistic or antagonistic effect of its several compounds such as hyperforin and flavonoids (Butterweck et al., 1997; Wurglics and Schubert-Zsilavecz, 2006).

Subsequently, we verified the direct effect of SJW and hypericin on Ca^{2+} channels. The JEG-3 cells were treated with SJW and hypericin for 10 min, where the Ca^{2+} uptake is likely to depend principally on membrane transfer (Moreau et al., 2001). Results showed that JEG-3 cells submitted to RuR had a dose-dependent variation of Ca^{2+} uptake at 1, 5, and 15 min (Table 2.1) with the lowest concentration (1 μM) causing the highest $[\text{Ca}^{2+}]_i$. The same effect was reported for primary culture of trophoblastic cells (Moreau et al., 2002b) and is probably due to a not yet described binding phenomenon between RuR and trophoblast Ca^{2+} channels similar to that found for voltage-gated Ca^{2+} neuronal channels (Cibulsky and Sather, 1999).

The results obtained from SJW and hypericin treatment after 10 min incubation did not show significant difference between these treatments and the negative control (figure 2.3C). Moreover, SJW or hypericin are significantly different from the lower RuR concentration (1 μM) at any time. Hence, these results suggest that SJW and hypericin influence $[\text{Ca}^{2+}]_i$ by a mechanism of regulation unrelated to SJW compounds or isolated hypericin binding to surface channels.

2.4.4. Effect of SJW and hypericin on Ca²⁺ transport protein expression

Subsequently, to assess the effect of SJW and hypericin on Ca²⁺ transport system, we investigated Ca²⁺ channel transporters and buffer protein expression. We analyzed the placental most important elements involved in this process: TRPV-6, TCTP, CaBP28K, and PMCA1/4.

Results obtained on Ca²⁺ protein expression under FKL treatment showed no significant altered protein expression (figure 2.4) confirming the direct effect of forskolin on increased [Ca²⁺]_i, which implicates the IP₃-mediated [Ca²⁺]_i store mobilization (Dai et al., 2008) and inhibition of voltage-sensitive calcium channels (VSCCs) (Park and Kim, 1996) but not a direct effect on Ca²⁺ protein expression regulation. Conversely, data from SJW and hypericin treatment showed a particular protein expression regulation (figure 2.4). SJW caused downregulation of TCTP protein expression only (figure 2.4A) while hypericin showed to interfere on Ca²⁺ membrane transport and buffer system. Precisely, hypericin caused upregulation of CaBP28K (figure 2.4B) and TRPV6 (figure 2.4D) and downregulation of PMCA1/4 protein expression (figure 2.4C). Additionally, since we did not observe differences between treatments and controls for mRNA expression levels (figure 2.5), we imply that the effect of SJW and hypericin on this protein expression is probably due to a translational regulation. It is worth to note that mRNA expression of CaBP28K did not reach detectable levels by the technique used in our study, and we were unable to affirm if this expression was transcriptional or translational regulated.

The TRP superfamily of channels contains several members that may serve the function of store operated channels (SOCs), promoting the calcium influx in nonexcitable cells. Members of this superfamily are classified into three major subfamilies: TRPC (for canonical), TRPV (for vanilloid), and TRPM (for melastatin) (Lafond and Simoneau, 2006). The TRPV subfamily express in placenta, includes TRPV6 and TRPV5, a highly Ca²⁺-selective channels (epithelial channels/Ca²⁺ transport). These Ca²⁺ channels constitute the rate-limiting influx step on active Ca²⁺ absorption that takes place in kidney, proximal intestine and placenta (Hoenderop et al., 2001).

Little is known in regards of placental intracellular machinery that maintains calcium homeostasis. However, studies suggest that Ca^{2+} -binding proteins (CaBPs) play a cardinal role in regulating or shuttling calcium in intracellular medium (Lafond and Simoneau, 2006). In placenta, the active Ca^{2+} transport across epithelia is correlated to CaBP-9K and CaBP-28K (Nikitenko et al., 1998), and the recently described translationally controlled tumor protein (known as TCTP or TPT1) (Arcuri et al., 2005). The higher expression of CaBP28K in syncytiotrophoblast compared to cytotrophoblast cells shows a relation between fetal needs and progressive increasing on CaBPs expression by placenta during pregnancy (Belkacemi et al., 2004). In addition, in placental tissue, a direct relation was established between some extracellular factors and the regulation of CaBPs expression such as the influence of hormones (PTHrP) (Hershberger and Tuan, 1998) and $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ (Belkacemi et al., 2005b) (vitamin D). TCTP is transcriptionally and posttranscriptionally regulated by Ca^{2+} (Xu et al., 1999) and shows characteristics related to Ca^{2+} handling function different from other known families of CaBPs. Evidences indicate that TCTP is an inducible protein that is expressed in a tissue-specific way and whose synthesis responds to stimulus.

Finally, during pregnancy, fetal blood Ca^{2+} concentration is higher than maternal concentration, resulting in a maternal-fetal Ca^{2+} gradient that is maintained by the presence of several components such as the plasma membrane Ca^{2+} ATPase (PMCA) (Belkacemi et al., 2005a).

To summarize, our results demonstrated that, in a specific way, SJW and hypericin affected the trophoblasts-like cells, JEG-3, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ through downregulation of TCTP (SJW) and PMCA1/4 (hypericin) and upregulation of TRPV-6 and CaBP-28K (hypericin). Also, through statistical analysis, there was no significant difference on Ca^{2+} uptake assays between the two concentrations of hypericin, even though the 7.5 ng/mL curve is displaced upper the 75 ng/mL at 20 min. Perhaps, this difference is related to the unlike pattern of CaBP28 and TRPV6 expression found for each concentration of hypericin. Unfortunately, our results did not allow to go further with the conclusions and establish the cause of higher $[\text{Ca}^{2+}]_i$ with lower concentration of hypericin. Also, previous study demonstrated differences in

antidepressant activity when testing SJW or its fractioned compounds indicating synergistic or antagonistic effect of substances (Butterweck, 2003). Thus, in the present work, the singular result found for SJW treatment on both Ca^{2+} transport and TCTP protein expression might be attributed to several compounds in the whole extract. In this case, it would be worth to study different fractions of the extract or other isolated substances such as hyperforin or flavonoides on trophoblast Ca^{2+} uptake.

In conclusion, placenta represents the primary site of regulation of fetal Ca^{2+} homeostasis, which depends upon the successful formation of this organ (Jansson and Powell, 2006; Lafond and Simoneau, 2006) and different *in vitro* cell models have been used to clarify these mechanisms in trophoblast cells (Whitley, 2006). Therefore, this study provides once more the confirmation of human choriocarcinoma cell line - JEG-3 application as *in vitro* cellular model for the study of trophoblast Ca^{2+} transport regulation. The results did not show evidence of significant toxicity of SJW related to trophoblast differentiation. However, the studies involving the Ca^{2+} uptake and Ca^{2+} transport proteins expression showed that SJW and hypericin can interfere on the adaptative regulation of Ca^{2+} transport in different steps of the Ca^{2+} flux. As a result, the administration of SJW as a safety alternative for depression and anxiety during pregnancy without affecting fetus development and Ca^{2+} needs is uncertain.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

2.6. Legend of figures

Figure 2.1. Dose-dependent effect of SJW on JEG-3 cells viability. MTT technique was used and results were expressed in percentage of controls (CTL) (A). JEG-3 cells were fixed and stained with propidium iodide (PI) for nuclei and with a specific antibody for plasma membrane desmosomes (green). Images represent not altered JEG-3 cells treated with DMSO (B) and cells treated with SJW at 75 $\mu\text{g/mL}$ (C). Microscopic examination showed cell vacuolization and nuclei displacement (white arrows). Cells were observed by confocal microscopy (Original magnification 400X). MTT data are representative of 5 experiments made in quadruplicate. Student's *t* test; * $p < 0.05$ *** $p < 0.0001$.

Figure 2.2. Effect of SJW (25 $\mu\text{g/mL}$) or hypericin (7.5 and 75 ng/mL) on hCG production. Control (CTL) consisted of cells treated with DMSO only or forskolin (FKL) at 50 μM . Data represent mean \pm SEM of 3 individual experiments made in duplicate. Control cells were reported to the same ratio value of 1.0. One-way ANOVA was followed by Tukey's multiple comparison test; *** $p < 0.0001$.

Figure 2.3. Effect of SJW at 25 $\mu\text{g/mL}$ (•••) or hypericin at 7.5 ng/mL (••) and 75 ng/mL (•••) on JEG-3 cells Ca^{2+} uptake. Cells were pretreated for 24 h (A and B) and 10 min (C) with SJW, hypericin and controls. The Ca^{2+} uptake was done at different time points (0 to 20 min) using $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Control (CTL) consisted of cells treated with DMSO (<0,01%) (••), forskolin (FKL) at 50 μM (•••) or ruthenium red (RR) (•••). The Ca^{2+} uptake were expressed as nmol of Ca^{2+} per mg of cellular proteins. Linear (A) and non-linear (B) phase are shown. Data represent mean \pm SEM of 3 (C) to 5 (A and B) individual experiments made in duplicate. One-way ANOVA test followed by Tukey's multiple comparison test ($p < 0.05$; * SJW vs CTL; ϕ FKL vs CTL; #7.5 ng/mL vs CTL; ϵ 75 ng/mL vs CTL) and test *t* (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; RR vs CTL) were used to analyze each time point.

Figure 2.4. Effect of SJW at 25 $\mu\text{g/mL}$ or hypericin at 7.5 ng/mL and 75 ng/mL treatment on Ca^{2+} transport proteins TCTP (A), CaBP28 (B), PMCA1/4 (C), and TRPV-6 (D) expression in JEG-3 cells by Western blot. Results were expressed as a ratio of control cells which consisted of cells treated with DMSO only (CTL) or forskolin (FKL) at 50 μM . Data from 5

(CaBP28, n=3) different experiments were compared and analyzed with paired *t* test ($p < 0.05$; *vs CTL; ϕ vs FKL; $p = 0.0080$; ** vs CTL).

Figure 2.5. Effect of SJW at 25 $\mu\text{g/mL}$ or hypericin at 7.5 ng/mL and 75 ng/mL treatment on Ca^{2+} transport proteins TCTP (A), PMCA-1 (B), PMCA-4 (C), and TRPV-6 (D) mRNA expression in JEG-3 cells by semi quantitative Real-time PCR. Control (CTL) consisted of cells treated with DMSO only or forskolin (FKL) at 50 μM . Results are expressed by the normalized ratio of each sample using ribosomal gene 18S as reference. Data represent mean \pm SEM from 3 different treatments.

Table 2.1 Effect of ruthenium red on JEG-3 cells Ca^{2+} uptake. To verify the dose-response of Ca^{2+} uptake, cells were treated with increasing concentration of ruthenium red (1 to 1000 μM) for 10 minutes and uptakes were performed in HBSS for 1, 5 and 15 minutes. Control consisted of HBSS treated cells. Results are expressed as nmol of Ca^{2+} /mg of protein

Time (min)	Ruthenium red (μM)				CTL
	1	10	100	1000	
1	4,34(\pm 1,56)**	5,43(\pm 2,81)**	3,49(\pm 1,31)***	1,23(\pm 0,81)*	0,37(\pm 0,23)
10	6,95(\pm 2,82)**	6,05(\pm 2,01)*	5,21(\pm 2,5)*	3,55(\pm 1,21)*	1,11(\pm 0,52)
15	6,39(\pm 1,47)*	7,89(\pm 1,83)***	6,00(\pm 2,41)*	3,32(\pm 0,65)	2,82(\pm 0,69)

Results represent the mean \pm SEM of 3 experiments performed in duplicates. Data were compared and analyzed with paired *t* test (* p <0.05 ** p <0.01 *** p <0.001).

Figure 2.1

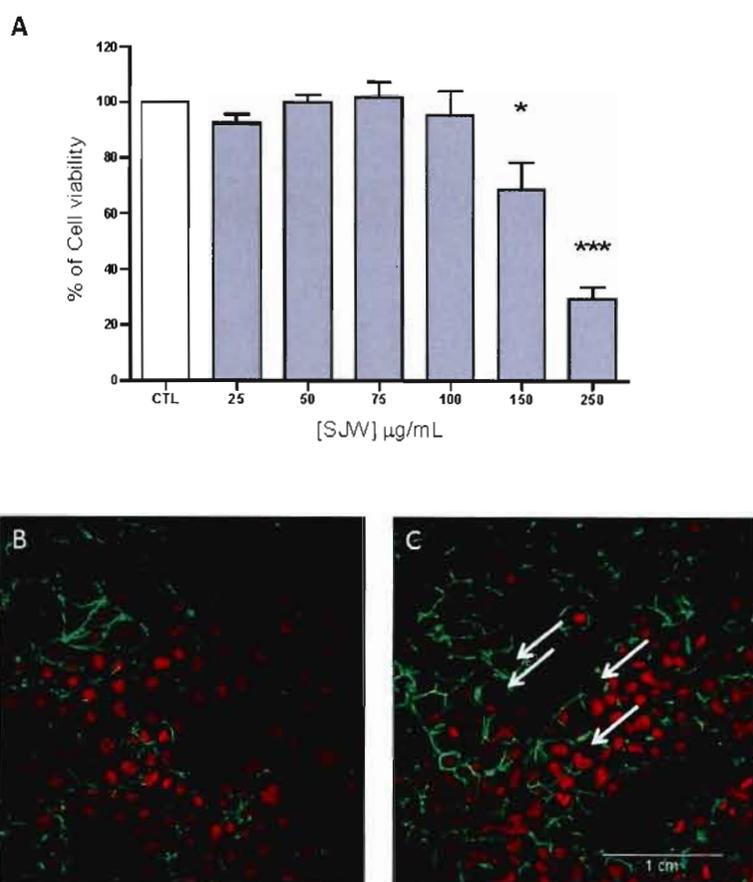


Figure 2.2

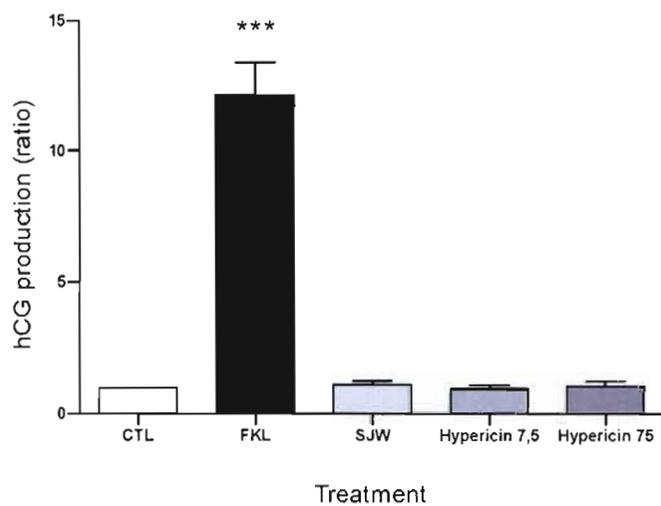


Figure 2.3 A et Figure 2.3 B

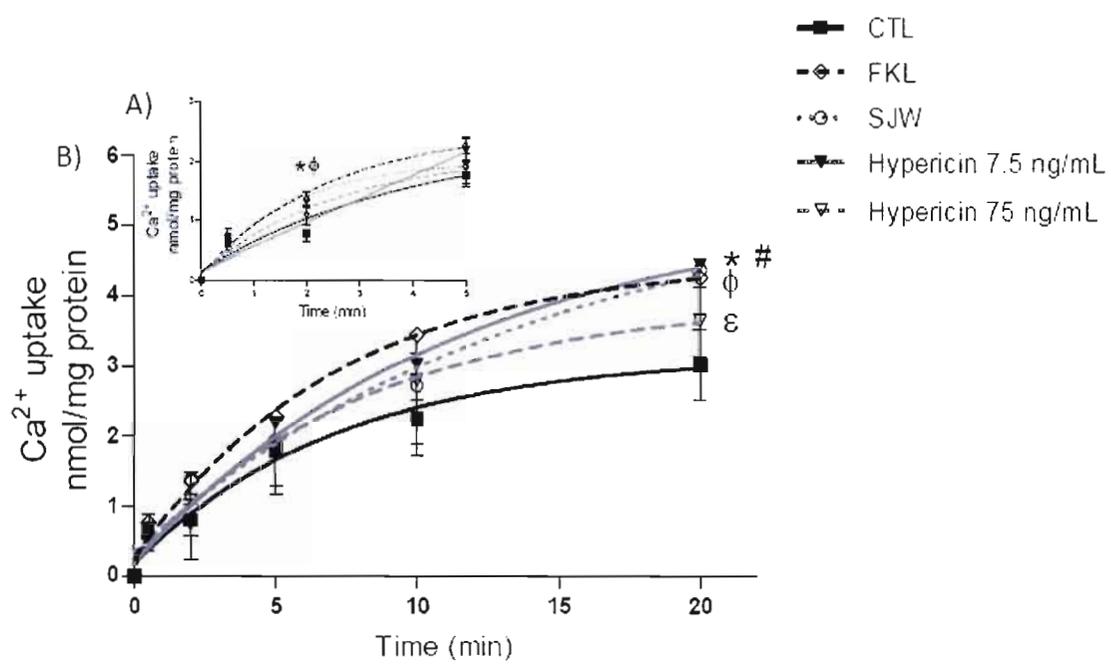


Figure 2.3 C

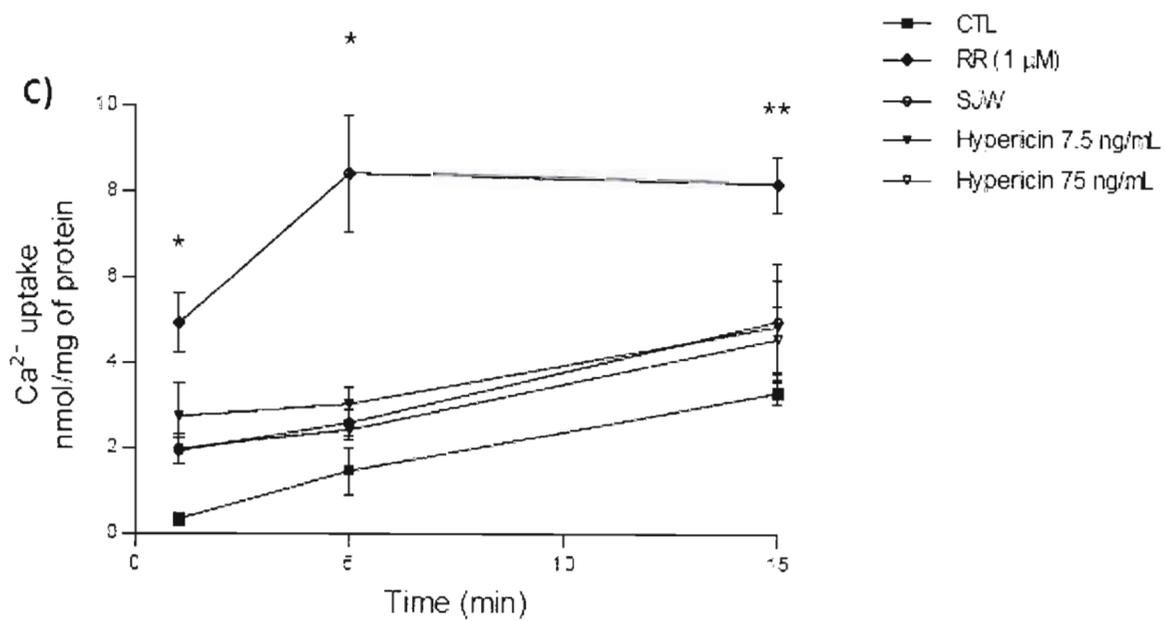


Figure 2.4

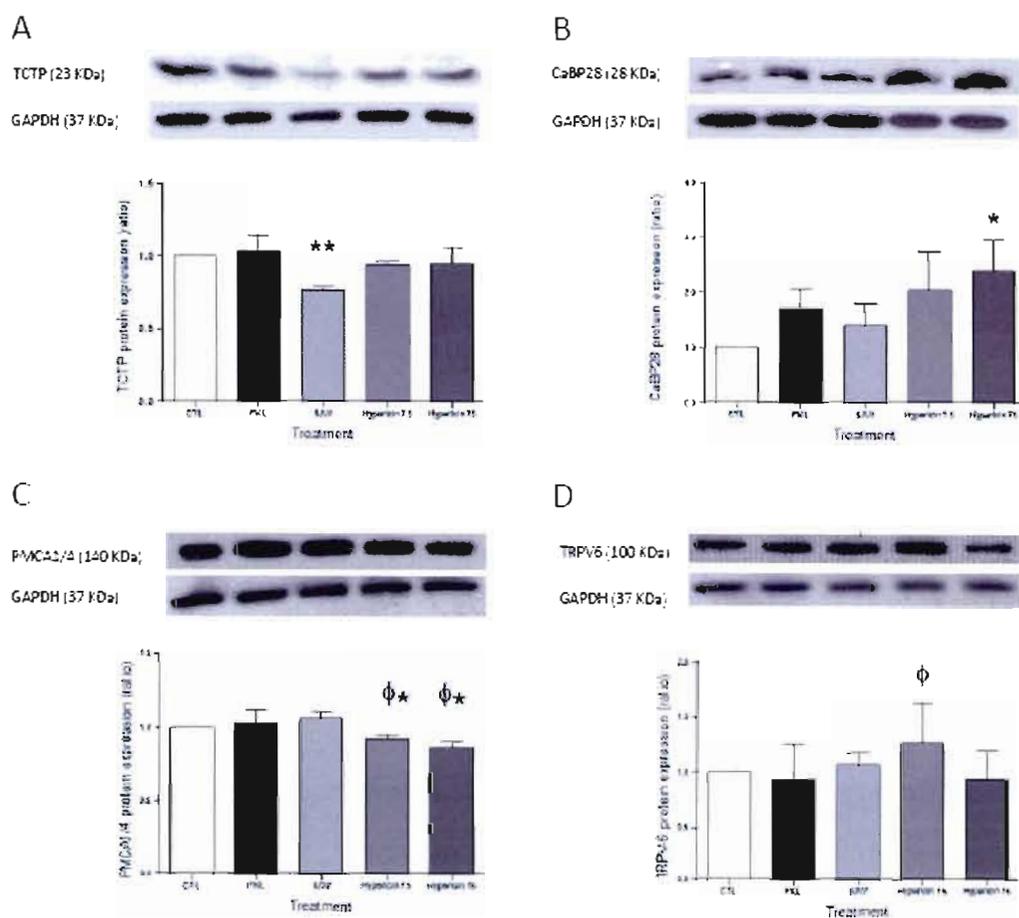
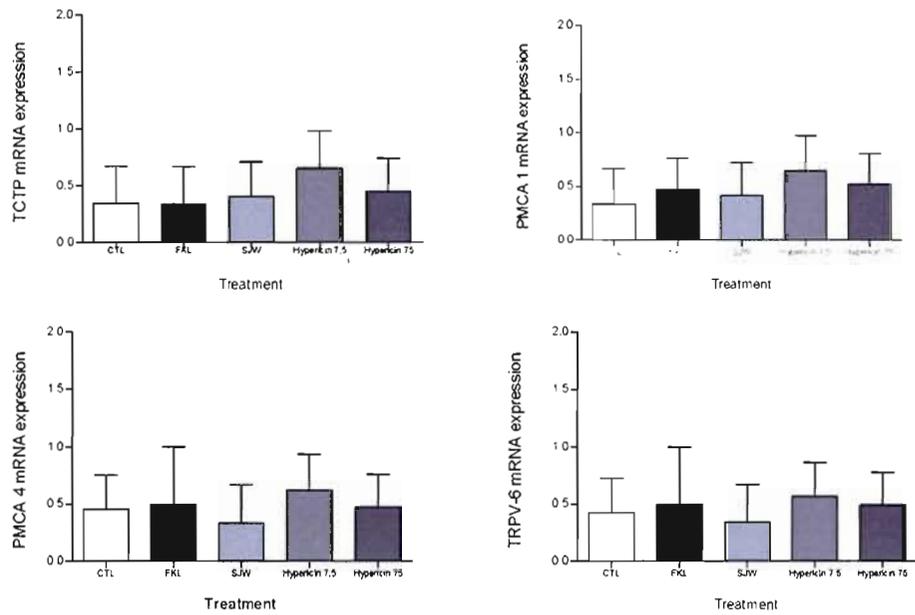


Figure 2.5



CHAPITRE 3

DEUXIÈME ARTICLE

Avant-propos

« *Genipa americana* (Rubiaceae) fruit extract affects human trophoblasts derived BeWo cells MAPK pathway activation: implication on placental development » par Aline Oliveira da Conceição, Maria Helena Rossi, Fernando Faustino de Oliveira, Larissa Takser et Julie Lafond.

Le deuxième article qui constitue cette thèse porte sur la plante *Genipa americana* (appellation courante: jenipapo, jaguar, irayol, maluco ou caruto). Cette plante est un arbre fruitier du Brésil et d'Amérique Centrale utilisé à des fins médicinales. En nous basant sur la présence dans son fruit de substances dont l'hépatotoxicité a été rapportée dans la littérature et de son importante utilisation populaire sous forme de liqueur alcoolisée, nous avons émis comme hypothèse que les substances présentes dans l'extrait éthanolique du jenipapo pourraient aussi avoir un effet toxique sur le placenta. Partant de cette hypothèse, les buts du présent travail sont d'identifier les composants phytochimiques présents dans l'extrait éthanolique du fruit de *G. americana* et d'évaluer l'influence de cet extrait sur la différenciation des cellules BeWo en couvrant les différents aspects biochimiques, morphologiques et enzymatiques de ce processus.

Pour ce travail, j'ai élaboré le design expérimental, j'ai réalisé toute la partie pratique qui porte sur l'effet biologique de l'extrait de la *Genipa americana* et j'ai rédigé l'article. Le Dr Fernando F. de Oliveira s'est chargé de la collecte de la plante avec la collaboration des botanistes de l'herbier de l'Université de Santa Cruz (Ilhéus, Brésil) et il a réalisé la

production de l'extrait végétal. Le Dr Maria H. Rossi a réalisé l'analyse phytochimique et participé à l'analyse critique de l'article. Dr Julie Lafond et Dr Larissa Takser ont également participé à l'analyse critique. L'article a été soumis au *Journal of Medicinal Food*.

***Genipa americana* (Rubiaceae) fruit extract affects human trophoblasts derived BeWo cells MAPK cell pathway activation: implication on placental development**

Running title: *G. americana* affects BeWo cells MAPK pathway

Aline Oliveira da Conceição^{a,b}; Maria Helena Rossi^c; Fernando Faustino de Oliveira^f;

Larissa Takser^d; Julie Lafond^{a,b,c,2}

^a *Laboratoire de Physiologie Materno-foetale, Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada*

^b *Centre de recherche BioMed, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada*

^c *Institut Santé-Société, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada*

^d *Département Obstétrique Gynécologie, Faculté de Médecine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada.*

^e *Centro de Sanidade Animal, Instituto Biológico, São Paulo, Brazil.*

^f *Laboratorio de Produtos Naturais, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, Brazil.*

² **Correspondence :** Prof. Julie Lafond, Centre de Recherches Biomédicales – Département de Sciences Biologiques. Université du Québec à Montréal C.P. 8888, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8 E-mail: lafond.julie@uqam.ca Fax: +1 514 987 67 63

3.1. Abstract

Genipa americana L. (Rubiaceae) is a fruit tree and a traditional medicine used to treat anemia, ictericiouness, asthma, and liver and spleen problems. The aim of the present work was to verify the effect of *G. americana* fruit ethanolic extract on trophoblasts-like cell proliferation/differentiation mechanism. Qualitative analysis of *G. americana* fruits extract was performed and BeWo cells, a well established placental choriocarcinoma cell line which can undergo differentiation. Methods consisted on viability/proliferation measurement, human chorionic gonadotrophin (hCG) release detection, cell fusion observation, and evaluation of cell signaling pathways: cAMP production and the mitogen-activated protein kinases (MAPK) phosphorylation. A stock solution of the extract was diluted in Ham's F-12 medium with 10% fetal bovine serum at concentrations ranging from 50 to 1000 $\mu\text{g/mL}$. Cells treated with dymethylsulfoxide (DMSO), forskoline (FKL), and MAPK inhibitors (PD98059 or SB203580) were used as control. FKL was used to induct differentiation state in BeWo cells. Phytoanalysis indicated the presence of steroids only. Results showed that the *G. americana* fruit extract did not interferon cell differentiation. However, a significant inhibition of cell growth related to inhibition and reactivation of ERK1/2 and p38 MAPK in BeWo cells was remarked. The results presented here showed evidences that steroids from *G. americana* have a potential effect on placental cell regulation.

Keywords: Choriocarcinoma; ERK1/2; forskolin; placenta; p38; syncytiotrophoblast.

3.2. Introduction

Genipa americana L. from the Rubiaceae family, popularly known as “Jenipapo” (Brazil), “jaguar” (Panama), “irayol” (Guatemala), “maluco” (Mexico), and “caruto” (Venezuela), is a fruit tree and traditional medicine native from Brazil and the Central America (Keeler, 1964; Lorenzi et Matos, 2002; Silva et Andrade, 2006). Fruits of this plant are comestible and when they are unripe, they give a blue to black juice that is used to tattoo the body. When ripe, the pulp is transformed in comfits, marmalade, wine, and liquor and every part of this plant is used in folk medicine. A tea that have a purgative and an anti gonorrheal properties can be prepared from roots (Mors et al., 2000; Lorenzi et Matos, 2002); decoction of the leaves is used against diarrhea and syphilis; ripe fruits are also indicated for anemia, ictericiouness, asthma, liver and spleen problems (Mors et al., 2000; Moreira et al., 2002). Moreover, due to its high content of mannitol, the fruits are recommended as anti hypertensive drug (Robineau, 1995).

Placenta represents the intimate connection between fetus and mother during mammalian pregnancy. This organ allows fetus to develop, maintains the pregnancy, and is responsible for maternal-fetal exchange. Other roles of placenta are synthesis and secretion of hormones, hematopoiesis, and heat transfer. This organ is also responsible for catabolic/metabolic, secretory, resorptive, and immunological functions (Hill and Longo, 1980; Saintonge and Rosso, 1983; Audus et al., 2002). Estrogens, for example, play important roles in fetal-placental development that may be mediated by paracrine and/or autocrine mechanisms (Younes et al., 1981). During placentation, human placenta differs from other types of placentas leading to formation of a hemomonolayer of trophoblast cells in which maternal and fetal circulations are never in direct contact. The placenta formation allows an intimate contact between embryo and nutrients via only one layer of multi-nucleated cells, the syncytiotrophoblasts (Leiser and Kaufmann, 1994; Malassine, 2001). These syncytiotrophoblasts are formed early in gestation, more specifically during the implantation stage (Boyd and Hamilton, 1966; Aplin, 1991). Therefore, the function of the human placenta is dependent upon the successful formation and expansion of syncytiotrophoblast. This layer expands through intercellular fusion with underlying

differentiating mononuclear villous cytotrophoblast, which is concurrently undergoing differentiation that includes decreased proliferative capacity and increased substances production (Cross et al., 1994; Rote et al., 2004). These substances characterize the biochemical differentiation of trophoblasts and include the production of hormones such as human chorionic gonadotrophin (hCG) and human placental lactogen (hPL) (Kliman et al., 1986; Morrish, 1987; Strauss et al., 1992).

The morphological differentiation of cytotrophoblasts into syncytiotrophoblast is defined by mechanisms of differentiation and fusion of mononucleated cytotrophoblast cells (Midgley et al., 1963). It is now known that one of the mechanisms of this morphological and biochemical differentiation is mediated by the extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) and the p38 enzymes (Daoud et al., 2005), two important subfamilies of the mitogen-activated protein kinases (MAPK), a family of protein kinases that under certain stimuli control cell proliferation, differentiation, apoptosis, embryogenesis, and regulation of inflammatory and stress responses (Kyriakis and Avruch, 2001).

Several *in vitro* fusogenic mechanisms have been explored to study trophoblast differentiation (Whitley, 2006). One of these models is BeWo cells, a well established choriocarcinoma cell line that retain many properties of their respective normal tissues (Fisher et al., 1989; Liu et al., 1997). Upon stimulation, these proliferative tumorigenic cells can undergo fusion and morphological differentiation similar to the formation of syncytiotrophoblast by the cytotrophoblast (Al-Nasiry et al., 2006; Dalton et al., 2007). The syncytialisation process of these cells can also be enhanced with forskolin α -(methgylamino) isobutyric acid (FKL) (Taylor et al., 1991). This substance is a cell permeable diterpenoid isolated from *Coleus forskohlii*, widely known to increase this cellular fusion in BeWo cells, and in other fusogenic cell lines through a cyclic adenosynomonophosphate (cAMP)-dependent mechanism (Wice et al., 1990; Kudo et al., 2003). So, due to its properties, this *in vitro* syncytiotrophoblast model has been used in predictive toxicological studies (Hamel et al., 2003; Plessow et al., 2003; Lafond et al., 2004; Meissner et al., 2005; Bechi et al., 2006) or to investigate placental transport and metabolism (Ampasavate et al., 2002).

Few studies showing phytochemistry composition or biological activity of *G. americana* are available. From its fruit, monoterpenoids and iridoids were isolated and characterized (Ono et al., 2005; Ono et al., 2007). One of these substances is genipin, an iridoid glucoside (Djerassi, 1960; Guarnaccia et al., 1972), which is causally related to the hepatotoxicity in rats (Yamano et al., 1990) indicating a toxic effect of compounds present in this plant. Besides, until now, no study considering the effect of *G. americana* on placental development was carried out. Consequently, the objective of the present study was to investigate the effect of *G. americana* fruits ethanolic extract on the mechanisms of placental cell proliferation/differentiation using BeWo cells as *in vitro* model.

3.3. Material and Methods

3.3.1. Plant material

G. americana L. (Rubiaceae) was collected through botanical field work in January 2006, in Rio de Engenho district, Ilhéus, Bahia, Brazil. Plant habitat was characterized by argillaceous ground, humidified environment, and cacao culture, in the Brazilian northeastern hieroglyphic forest (Mata Atlântica forest). Plant collection coordinates were 14° 51' S and 39° 04' W approximately 50 m.s.n.m. The voucher specimen were identified and deposited in the herbarium of the Universidade Estadual de Santa Cruz under identification number of 13.923. The collection of plant material was followed by separation and measurement. Briefly, plant dryness was performed in an incubator under forced ventilation for 8 h at 28°C. For this work, a 10 g sample of dried and powdered fruit material was macerated in 100 ml methanol for 24 to 48 h through direct contact with solvent and with mechanical agitation. The marc was filtered through Whatmann number 1 filter paper and evaporated to dryness under reduced pressure. The fruit material was soaked in recovered solvent once more to make a new extraction. To performe biological tests, a stock solution of *G. americana* ethanolic fruit extract was made diluting 200 mg in 100% sterile dimethyl sulfoxide (DMSO). Then, stock solution was diluted in Ham's F-12 medium (Gibco, Montréal, Canada) to give a final concentration of 10 mg/mL that was filtered with 10 µm pore filter

and distributed in aliquots. Both solutions were stored at -20°C . Immediately before used, the 10 mg/mL solution was diluted in Ham's F-12 medium containing 10% fetal bovine serum (FBS) at specific concentrations ranging from 50 to 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to perform biological tests.

3.3.2. Phytochemical analysis

Qualitative analysis of *G. americana* fruits extract was carried out following the technique described by Matos (1997): 1) Phenolic compounds were identified by dissolving the crude ethanolic extract in 1 mL of ethanol in which 3 drops of an alcoholic solution of 10% FeCl_3 was instilled. The presence of phenolic compounds is characterized by changing in solution into a blue to red color; 2) Flavonoids were identified adding magnesium tapes and 0.5 mL of acid chloride (Shinoda reactions) in 3 mL of the crude ethanolic extract. At the end of the reaction (effervescence), a red color indicates the presence of flavonoids. In a second tube, 3-4 mL of the crude extract were added to acid ($\text{pH}= 3$) and alkaline ($\text{pH}= 11$) solutions. Changing in color would represent the presence of flavonoides. Finally, the extract was subjected to silicagel 60G chromatography and eluted with methanol. Silica plate was sprinkled with vapors of ammonia; 3) Steroids and triterpenoids were identified by dissolving the crude ethanolic extract in chloroform and filtering it through Na_2SO_4 containing funnel. Next, 2 mL were used to add 1 mL of acetic anhydride ($(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$) and 3 drops of H_2SO_4 . The change of a blue color into a green color indicates the presence of steroids. A pale to red color indicates the presence of cyclic triterpenoids. 4) To identify alkaloids metabolites, NH_4OH was added to an aqueous solution obtained from the ethanolic extract followed by extraction with ether/chloroform for three times. The organic solution was treated with Na_2SO_4 and HCl . The acid solution was treated with Hager, Mayer and Dragendorff solutions. The presence of precipitates indicates the presence of alkaloids.

Also, a ^1H -nuclear magnetic resonance (NMR) was registered in MeOH-D_4 in Bruker DPX-300 apparatus.

3.3.3. Cell line

BeWo (ATCC - CCL-98 Manassas, VA) cells were used to perform the biological assays. Cells were maintained in Ham's F-12 (Gibco, Montréal, Canada) supplemented with 10% FBS in 5% CO₂ at 37°C. For all tests, control consisted of cells treated with DMSO which was < 0.05% (v/v).

3.3.4. Cell viability/proliferation

The cell viability/proliferation procedure was done seeding 10³ cells/well in 96 well plates. After 24 h seeding, BeWo cells were treated with different extract dilution and/or 50 µM of FKL, and MAPK inhibitors for 48 hours. Controls consisted of cells treated with DMSO only and hydrogen peroxide (H₂O₂, 30% solution; Sigma-Aldrich, Canada) at 50 µM, an oxidative stress inducer (Heazell et al., 2009). Cell viability/proliferation was determined by the WST-1 based colorimetric assay (Roche Applied Science, Laval, Canada). For that, WST-1 reagent was added to the cells treated for 48 h and incubated at 37°C and 5% CO₂. After 4 h incubation, the absorbance was measured with a wavelength of 450 nm using a reference wavelength of 655 nm. Also, microscopic analysis was done with an inverted light microscope in order to observe the confluence and cell aspect.

3.3.5. hCG production

For hCG release detection, BeWo cells were seeded in 24 well plates at a density of 4,5x10⁴/well. After 24 h seeding, cells were treated with 50, 250, or 500 µg/mL of the fruit extract with or without 50 µM of FKL. After 48 h of treatment, the influence of plant extract on hCG production in the supernatant was measured using ELISA kit (DRG®, Germany) which detects the β chain of the hCG molecule. For β-hCG dosage, 50 and 200 fold diluted samples were used following manufacturer's specifications. Conditioned media were harvested, centrifuged and frozen at - 20°C. For protein preparation, media was aspirated, cells were rinsed twice with ice-cold PBS, solubilized with ice cold RIPA buffer [10 mM Tris/HCl, pH 7.4; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1mM EGTA; 1% Triton 100; 100 mM sodium fluoride; 10 mM sodium pyrophosphate; 2 mM sodium orthovanadate (w/v)] supplemented with Complete Mini Protease inhibitor cocktail (Roche Applied Scientific,

Laval, Canada) following the technique described by Yoshimura et al (1987) in which cell lysates are clarified by centrifugation at 14 000 g for 10 min at 4°C. The cellular protein content of each well was evaluated by spectrophotometric quantification using bicinchoninic acid protein assay (BCA) reagent (Pierce, Rockford, IL, USA) composed with 25 v. solution A, 24 v. solution B and 1 v. of solution C, with bovine serum albumin (BSA) as standard.

3.3.6. Morphological evaluation of trophoblast differentiation by immunofluorescence assay

For morphological differentiation assay, BeWo cells were seeded at 4.5×10^4 cells/well of density and treated after 24 h incubation. After 48 h treatment, BeWo cells were stained with antidesmosomal antibody in order to see syncytium formation. The technique was described by Daoud et al. (2005) with some modification and it is briefly described. Cells were washed twice with phosphate buffer saline (PBS), fixed in methanol at -20°C for 10 min, washed again with PBS (three times), and then incubated in PBS containing 2% FBS (v/v) for 45 min, to eliminate non-specific binding. Thereafter, cells were rinsed with PBS and incubated in the presence of mouse anti-human anti-desmosomes monoclonal antibody (1/700) in PBS containing 0.2% BSA for 1 h at room temperature. After being washed three times with PBS, cells were incubated with Alexa Fluor 488 conjugated goat anti-mouse IgG (1/1000) for 1 h at room temperature in the dark. For nuclear staining, cells were incubated with propidium iodide (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for an additional 30 min at room temperature in the dark, washed three times with PBS, and viewed using a Nikon Eclipse TE300 camera (Nikon, Tokyo, Japan) equipped with a confocal laser-scanning microscope (Bio-Rad MRC1024, CA, USA). All observations were performed at 20X magnification on monolayer cells. A syncytium was defined as three or more nuclei in the same cytoplasm without intervening surface desmosomal membrane staining. The syncytium counting was performed in 5 microscopic fields per well taken randomly.

3.3.7. cAMP measurement

Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate, an ubiquitous second messenger involved in cellular differentiation, is converted from adenosine triphosphate (ATP) via adenylyl cyclases when activated exogenously by FKL (Taylor et al., 1991). To evaluate the interference of the extract on cAMP activation, BeWo cells (3×10^3 cells/well) were cultured in 96-well microplates and incubated overnight at 37°C (5% CO₂ and 95% humidity). After 24 h seeding, the medium was aspirated and 100 µL of FKL or/and plant extract (50, 250, and 500 µg/mL) with or without FKL were added to cell cultures. After 5 min of incubation, culture media was aspirated and 200 µL of diluted lysis reagent (supplied by manufacturer) was added at each well followed by 10 min shaking. The intracellular cAMP measurement was performed using the cAMP Biotrak Enzymeimmunoassay (EIA) system (Amersham – GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) as manufacturer's instructions. Briefly, 100 µL of standards and samples were added into each well in duplicate, followed by addition of 100 µL of antiserum. After a time period incubation of 2 h at 3-5°C, 50 µL of cAMP-peroxidase conjugate was applied into each well and the plate was incubated for another 60 min at 3-5 °C, after which aspiration and washing of wells were proceeded. Immediately, 150 µL of enzyme substrate was dispensed at each well and mixed for 30 min at room temperature (15-30°C). The reaction was stopped by pipetting 100 µL of 1.0 M sulphuric acid into each well and mixing the plate. The optical density was determined using 450 nm wave length and samples values were established from standard curve.

3.3.8. Trophoblast differentiation/proliferation cell signaling pathway

ERK1/2 and p38 phosphorylations were used to analyze the effect of *G. americana* fruit extract on trophoblast differentiation/proliferation cell pathway. Cells were seeded in 9.2 cm² Petri plates (1.8×10^5 cell/plate) and incubated for 24 h in 5% CO₂ and 95% humidity. Then, cells were treated with (a) MAPK inhibitors, PD98059 (50 µM) or SB203580 (10 µM), (b) plant extract (50, 250 and 500 µg/mL) with or without FKL (50 µM), (c) FKL (50 µM), and (d) DMSO only (concentration of vehicle present in PD98059/SB203580 treated cells <0.1%). Doses of MAPK inhibitors were established by dose-dependent tests (data not shown) and literature reference (Daoud et al., 2005). After 48 h incubation, cells were

harvested to perform Western blot technique. Also, when achieving 50% of confluence, cells were incubated at 37°C with Ham's-F12 without serum for 24 h. After that, cells were washed with PBS (37°C) for three times and they were incubated again with Ham's-F12 without serum for 2 h. Then, cells were treated with specific MAPKinase inhibitors, PD98059 (50 µM) and SB203580 (10 µM), plant extract (50, 250 and 500 µg/mL), and DMSO only, for 1 hour. All treatments were done in serum free medium. Thus, cells were stimulated with medium containing 20% serum to give a final volume of 10% FBS at various time points: zero (without FBS stimulation), 1 min, 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 60 min, and 120 min. As described in section 5, cell lysates were obtained using RIPA buffer and protein concentration was determined by BCA reagent assay.

For the electrophoresis, equal amount of proteins (typically 15 µg) were solubilized in sample buffer (RIPA) and resolved in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (SDS-PAGE). Proteins were electrotransferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (1.7 mA/cm²) (Millipore, Cambridge, ON). The membranes were blocked with 5% fat-free dry milk (w/v) in Tris-Buffered Saline-Tween 20 (TBS-T) [10 mM Tris/HCl pH 7.6; 150 mM NaCl; 0.05% Tween 20 (v/v)] for 1 hour at room temperature. Membranes were then incubated overnight at 4°C with primary antibodies: antiphospho-ERK1/2 (1/1000, Cell Signaling, Beverly, MA, USA) and antiphospho-p38 (1/1000, Cell Signaling, Beverly, MA, USA) in TBS-T/5% BSA. Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) rabbit mAb detects endogenous levels of p44 and p42 MAP Kinase (Erk1 and Erk2) when dually phosphorylated at Thr202 and Tyr204 of Erk1 (Thr185 and Tyr187 of Erk2), and singly phosphorylated at Tyr204. These antibody does not cross-react with the corresponding phosphorylated residues of either SAPK/JNK or p38 MAP kinase. Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) antibody detects endogenous levels of p38 MAPK only when activated by phosphorylation at Thr180 and Tyr182. This antibody does not cross-react with the phosphorylated forms of either p42/44 MAPK or SAPK/JNK. It also reacts with p38 singly phosphorylated at Thr180 and singly phosphorylated at Tyr182. After overnight incubation, membranes were washed three times with TBS-T, and probed with secondary antibodies (1/2500 for antirabbit-IgG, Cell Signaling, Beverly, MA, USA) for 2 h at room temperature.

Blots were washed three times with TBS-T and the detection was performed using the BM chemiluminescence system (Roche Applied Scientific, Laval, Canada) and visualized by autoradiography. After stripping with 0.2 M glycine, 0.5 M NaCl, pH 2.5, membranes were similarly stained with anti-ERK1/2 (1/1000, Cell Signaling, Beverly, MA, USA) and anti-p38 (1/1000, Cell Signaling, Beverly, MA, USA; p38 MAPKinase antibody detects endogenous levels of total p38 α , - β or - γ MAPK protein). This antibody does not recognize p38 δ , JNK/SAPK or p44/42 MAPK) in TBS-T/5% BSA. After overnight incubation, membranes were washed three times with TBS-T, and probed with secondary antibodies (1/2500 for anti-rabbit-IgG) for 2 h at room temperature. Mouse anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH – 36 KDa, 1:5000 in TBST-5% BSA, Chemicon, Temecula, CA) and HRP-conjugated goat anti-mouse-IgG (1:10.000 in TBST-5% milk, Chemicon, Temecula, CA) as the second antibody were used to normalize the protein amount. Quantification was carried out by digitizing the images with a computer-based image analysis system and measuring the band intensities in grey-scale pixel values (Image J 1.38x, National Institutes of Health, USA).

3.3.9. Statistical analysis

For cell viability, data were analyzed by paired *t* test, and One-way ANOVA test followed by Tukey's test. Statistical analyses were performed with the Prism software (version 5.0; GraphPad Software, 2007, Santa Cruz, CA).

3.4. Results

3.4.1. Phytochemical analysis

The qualitative tests showed the presence of steroids only. The chemical displacement showed by the $^1\text{H-NMR}$ spectra were in the region of methyl (1-2 ppm) and aliphatic (3-4 ppm) but not aromatic hydrogen (6-8 ppm) confirming the absence of phenolic compounds which include flavonoids.

3.4.2. Cell viability/proliferation

The BeWo cell viability/proliferation after 48 h incubation was assessed using WST-1 solution. Results showed that even at high doses, *G. americana* fruit extract did not cause morphological toxic effects under physiological doses ($\leq 100 \mu\text{g/mL}$). However in concentrations varying from 50 to 500 $\mu\text{g/mL}$, being more accentuated at 500 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,005$), a significant decrease in cell growth was observed (figure 3.1A). In the same manner, FKL and plant extract combined treatment did not show cytotoxicity of BeWo cells and a significant decrease in cell growth was only observed with the combined treatment of 500 $\mu\text{g/mL}$ and FKL ($p < 0,05$).

The effect of MAPK inhibitors with or without *G. americana* on cell viability proliferation (figure 3.1B) after 48 h was also analyzed. In the same manner, no toxic effects were observed in BeWo cells treated with MAPK inhibitors. Results from WST-1 test showed that the inhibition of ERK1/2 pathway by PD 98059 (50 μM) cause a significant decrease in cell growth ($p = 0,0094$) confirming the involvement of this MAPK pathway in trophoblasts-like cells proliferation (figure 3.1B). Moreover, this putative antiproliferative state was intensified when PD 98059 was administered together with 50 and 500 $\mu\text{g/mL}$ of the extract. It was also shown that the inhibition of p38 MAPK pathway by SB203580 alone did not affect the BeWo cell viability or proliferation (figure 3.1B). However, the administration of SB253080 together with plant extract at 50 and 500 $\mu\text{g/mL}$ leads to a significant decrease in cell growth. In addition, the putative antiproliferative effect was also seen for MAPK pathway inhibitors combined treatment (PD98059+SB203580) ($p = 0,0047$) which was again accentuated by the presence of plant extract at 50 $\mu\text{g/mL}$ (vs CTL,

p=0,0017; vs PD98059+SB203580, p=0,0368) and 500 µg/mL (vs CTL, p=0,005, vs PD98059+SB203580, p=0,0090).

3.4.3. Effect of *G. americana* fruit on biochemical trophoblast-like cell differentiation

The cytotrophoblast differentiation is characterized by fusion of adjacent cells to form a giant multi-nucleated cell (syncytiotrophoblast) and by hCG hormone production. This can be assessed *in vitro* by stimulating trophoblast-like cells with FKL for 48 h (Taylor et al., 1991). Thus, to assess the effect of *G. americana* on BeWo cells differentiation, biochemical and morphological differentiation were analyzed. First, the biochemical differentiation was done by measuring the differentiation marker hCG hormone in the supernatant (figure 3.2A). As expected, FKL stimulated BeWo cells showed an increased secretion of hCG after 48 h incubation. Cells treated with plant extract only, did not show changes in hormone levels even though a slight decrease of hCG secretion was observed when cells were treated with FKL and plant extract (50 and 500 µg/mL) together.

3.4.4. Effect of *G. americana* on morphological trophoblast-like cell differentiation

Also, we analyzed the effect of *G. americana* on BeWo syncytial formation (figure 3.2B-C). Results indicated that, similar to biochemical differentiation results, this plant extract did not induced morphological differentiation. However, when BeWo cells were treated with FKL and plant extract at 500 µg/mL concomitantly, a decrease on syncytia formation was evident.

3.4.5. Monitoring cAMP production

It is known that the induction of syncytial formation by FKL is characterized by the cAMP pathway activation. Consequently, we investigated if the effect of *G. americana* fruit extract to FKL was related to the interference on cAMP activation (figure 3.3A). Results showed that *G. americana* alone did not lead to cAMP production nor interfered on cAMP production by FKL.

3.4.6. Effect of *G. americana* fruit on MAPK activation in trophoblast-like cells

In order to determine the MAPK signaling state that originated the inhibition of cell growth, we first investigated the phosphorylation state of both MAPK after 48 h incubation. Results showed that ERK1/2 and p38 were strongly activated by FKL after 48 h incubation (figure 3.3B-E). BeWo cells treated with MAPK inhibitors PD98059 and SB203580 presented ERK1/2 activation nearby the basal level (CTL) (figure 3.3B) and significant activation of p38 MAPK after this period of time by both inhibitors (figure 3.3C). The results also showed that curiously the inhibition by SB203580 lead to a positive feedback stimulation which resulted in exacerbation of the phosphorylated state after 48 h incubation (figure 3.3C). Cells treated with different concentrations of *G. americana* fruit extract did not show significant influence on ERK1/2 and p38 activation at 48 h (figure 3.3D and 3.3E). Meanwhile, FKL and *G. americana* combined treatment lead to a variable and inferior activation of both pathway when compared to FKL alone (figure 3.3D and 3.3E). In addition, *G. americana* fruit extract at 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ showed to reduce drastically the amount of total p38 MAPK expression and consequently its phosphorylated form.

Next, in order to analyze the influence of *G. americana* fruit extract on inhibition and rapid and sustained reactivation of ERK1/2 and p38 MAPK, we proceeded the time course of these signaling pathways (figure 3.4 and 3.5) and we established the fold-induction of MAPK phosphorylation after 1 h inhibition (time zero). Results showed that, although the kinetics of ERK1/2 phosphorylation following treatments were slightly variable with different passages of BeWo cells, a biphasic response with an intense early phosphorylation by 5 min (11.7-fold-induction) to 15 min (18.9-fold-induction), and a decrease towards baseline levels at 30

min, followed by a second, sustained phase of phosphorylation by 60 min was consistently observed using the control PD98059 (figure 3.4A). Cells treated with DMSO only for 1 hour presented a basal phosphorylation (annexe 1.1a). In general, the plant extracts lead to an inhibition of ERK1/2 phosphorylation and reactivation at early phase (by 5 min) similar to PD98059 (figure 3.4B to 3.4D). However, besides dose-dependent ERK1/2 reactivation, they caused less intense induction of phosphorylation compared to PD98059. Plant extract induction of phosphorylation was 1.6, 5.4 and 8.6 fold at 5 min for 50, 250 and 500 $\mu\text{g/mL}$, respectively; and 1.3, 4.4 and 8.6 fold at 15 min for 50, 250 and 500 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Besides, different from the control PD98059, the extracts did not lead to sustained reactivation at the late phase (after 30 min).

The incubation with SB203580 showed a specific kinetic pattern of p38 reactivation in BeWo cells studied (figure 3.5A). The p38 reactivation occurred rapidly (5 min), exhibiting a strong increasing ratio of 19.16-fold after 5 min, followed by a reactivation by 15 min and sustained activation until 60 min. Incubation with *G. americana* fruit extract showed a dose specific p38 MAPK phosphorylation pattern that differed from the control SB203580. The plant extract at 50 $\mu\text{g/mL}$ showed a weaker reactivation of p38 by 5 min (3.3-fold induction) reaching higher levels by 10 min (9.1-fold induction), followed by a sustained reactivation until 120 min. At 250 $\mu\text{g/mL}$, the inhibition and reactivation were less intense showing initial reactivation of 5.87-fold by 5 min, followed by reactivation (8-fold) by 30 min and a non sustained phosphorylation after 60 min. Control cells treated for 1 hour with DMSO did not present reactivation (annexe 1.1b). At 500 $\mu\text{g/mL}$, the phosphorylation induction was also less strong than the control SB203580 by 5 min (7.3-fold-induction) and it was sustained until 120 min.

3.5. Discussion

G. americana L. is a very well-liked medicinal plant. Its fruits are suitable for eating and popular as a source of beverages and jams. Although its popularity around many regions of Brazil makes this plant an object of study for commercializing and validation of its benefits, little is known about the relation between its secondary compounds and mammal cell biology.

From the fruits, monoterpenoids were isolated and identified. Initially, the iridoids: genipin, geniposidic acid, and geniposide were reported in this fruit (Djerassi, 1960). More recently, four new iridoid glucosides, called genamesides A—D (Ono et al., 2005) and three monoterpenoids called genipacetal, genipamide, and genipaol were described (Ono et al., 2007). In our study, in order to investigate the presence of secondary compounds, we performed a preliminary qualitative analysis of the fruits extract. Remarkably, our results confirmed the occurrence of steroids but not terpenoids, flavonoids, and other secondary compounds. The absence of terpenoids in our material may be explained by some aspects of plant collection such as botanic diversity or stage of maturation of the fruit. The reports found in the literature about *G. americana* compounds describe fruits collected from a different geographic condition and stage of maturation (Ono et al., 2005; Ono et al., 2007). Additionally, the already described chemical composition variability of different ripping phase (Figueiredo, 1986) and perishability (Silva et al., 1998) of *G. americana* may also contribute for this variability.

Even if natural products have different synthesis pathway and particular molecular arrangement, they can interfere in mammal cellular metabolism. There are evidences of the influence of plant compounds in cell signaling pathways that may lead to regulation of cell differentiation (Kim et al., 2007) and function (Jin et al., 2006).

The establishment and function of the human placenta is dependent on the proliferation, migration, and invasion of trophoblast into the maternal deciduas and myometrium (Aplin, 1991; Cross et al., 1994). During this stage, fusion and differentiation of cytotrophoblast cells, which includes decrease proliferative capacity and increased production of hormones, form the syncytiotrophoblast, a multinuclear layer (Midgley et al., 1963; Rote et al., 2004). It is known that normal cell proliferation and differentiation are well controlled events orchestrated by transduction of cell signals (Peeyush et al., 1999). In the case of trophoblast cells, it is known that its differentiation and proliferation processes are associated with a cAMP/protein kinase A (PKA)-dependent pathway (Wice et al., 1990; Strauss et al., 1992; Keryer et al., 1998) and MAPK (Daoud et al., 2005; Forbes et al., 2008).

In this work, we chose the *in vitro* model BeWo cells to study the cellular aspects related to proliferation and differentiation of trophoblasts regarding to *G. americana* fruit ethanolic extract exposition. Results showed that this fruit extract did not cause morphological toxicity for BeWo cells at concentrations ≤ 500 $\mu\text{g/mL}$. However, *G. americana* fruit extract cause a significant inhibition of BeWo cells growth even under physiological doses (≤ 100 $\mu\text{g/mL}$). In addition, the effect of MAPK pathways on viability/proliferation of trophoblasts was also investigated. In the same manner, no morphological cytotoxic effect was seen for MAPK inhibitors treatment. However, data showed a strong inhibition of cell growth by PD98059 treatment alone or in combination with SB253058 or plant extract but not SB253058 alone. These results give one more clue of the involvement of Ras-Raf-mitogen-activated protein kinase/ERK kinase pathway (Taylor et al. 1991) in BeWo proliferation as a tumor cell type.

Next, the biochemical and morphological differentiation markers analysis showed that this fruit extract did not cause a direct effect on BeWo cells differentiation through hCG release or syncytial formation. A significant decrease on FKL morphological differentiation (syncytial formation) induction was observed only with high concentration of the extract (500 $\mu\text{g/mL}$). These results lead to think that there may be a dose-dependent combined action of steroids found in *G. americana* and the diterpenoid forskolin which may regulate both differentiation and proliferation of BeWo cells. Additionally, this effect is related to a mechanism dependent of MAPK but not of cAMP pathway since our results showed that *G. americana* fruit alone or in combination with FKL had no influence on cAMP production (figure 3.3A).

Then, we studied the phosphorylation state (activation) of ERK1/2 and p38 MAPK at the suitable time of differentiation (48 h) (figure 3.3B to 3.3E). At this time, a high activation of ERK1/2 (figure 3.3B and 3.3C) as well as of p38 MAPK (figure 3.3D and 3.3E) by FKL was identified and confirms the involvement of FKL on MAPK pathway via cAMP production at long term stimulation (Ehshes et al., 2003; Fang and Olah, 2007). Conversely, PD98059, SB203580 and *G. americana* fruit extract did not result in increased activation of

ERK1/2 at this long term time point (figure 3.3B and 3.3D). In contrast, we observed a significant sustained activation of p38 MAPK by PD98059, SB203580, and *G. americana* fruit extract with exception of 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of the extract that caused a downregulation of total p38 (figure 3.3C and 3.3E). Thus, the results from 48 h stimulation on the MAPK activation and biochemical/morphological differentiation showed that *G. americana* fruit extract alone did not interfere on MAPK activation nor on the FKL induced differentiation.

Thus, although BeWo cells showed to be a suitable model for placental mechanism studies, demonstrating a good response to positive controls, an unforeseen result related to SB203580 effect after 48 h incubation was observed (figure 3C). It seems that after 48 h incubation this inhibitor is not implicated on BeWo cell proliferation and, surprisingly, it produces activation of p38 MAPK. There is a lack of information in the literature that explains this effect on BeWo cells differentiation or proliferation. However the significant increased phosphorylation of p38 in these cells treated for 48 h with SB203580 may be explained by: 1- the involvement of this molecule in other cell signaling pathways; 2 - partial specificity for p38 isoforms; and/or 3 - as an apparently non toxic secondary effect of this drug. SB203580 is a pyridinyl imidazole compound that specifically inhibits p38 α and p38 β but not p38 γ and p38 δ through competition with ATP for the same binding site on the p38 kinase (Lee et al., 1994; Cuenda et al., 1995). Studies on the proximal regulator of this event, the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PKB) (Akt/Rac) kinase pathway, showed that SB203580 also can block the phosphorylation and activation of PKB by inhibiting the PKB kinase, phosphor-inositide-dependent protein kinase 1 at concentrations excess of 2 μM (Lali et al., 2000). In the present study, the time course inhibition of p38 activation was achieved using 10 μM concentration.

Furthermore, the rapid activation of MAPK in response to mitogens in various cell lines has implicated these kinases in the control of cell proliferation (Rubinfeld, 2004). Consequently, we performed the time course of ERK1/2 and p38 MAPK in BeWo cells. Results demonstrated that both pathways were inhibited by *G. americana* fruit extract after 1 hour incubation similar to the controls used; however, different pattern of reactivation was

remarked. The *G. americana* time course revealed a less strong and not sustained reactivation of ERK1/2 compared to PD98059 which means that *G. americana* plant extract were able to sustain the inhibition of this cell pathway and, subsequently, inhibition of cell proliferation. This is confirmed by the viability/proliferation test results (figure 3.1B) that show a more accentuated decrease on BeWo growth in a PD98059 and *G. americana* combined treatment. In relation to p38 MAPK pathway reactivation, a different effect was obtained. The capacity to sustain the reactivation by FBS (that was weaker than SB203580 at early FBS stimulation time) showed to be particularly dose-dependent variable (figure 3.6B to D). Even though *G. americana* fruit extract presented different reactivation pattern comparing to controls, it is possible that this pattern presented on both ERK1/2 and p38 pathways inhibition and reactivation at immediate-early time period (beginning of the treatment) reflects its action on trophoblast proliferation after 48 h incubation. This idea is based on the fact that signaling intersection and cross-talk between p38 and ERK1/2 in attempt to coordinate the resulted cell proliferation have already been reported for other cells proliferation (Sharma et al., 2003) and that both cell pathways are important for the initiation of trophoblasts differentiation process (Daoud et al., 2005).

Researchers demonstrated the effect of plant compounds on cell metabolism. Kuo et al. (2005) reported that the geniposide isolated from *Gardenia jasminoides* could cause the induction of GSH S-transferase activity in rat hepatocytes by a mechanism mediated through the expression of MEK-1 signaling proteins and the activation of Ras/Raf/MEK-1 signaling pathway. Moon et al. (2007) demonstrated that the activation of ERK and the inactivation of PI3K/Akt have important roles in β -sitosterol (SITO)-induced-apoptosis in MCA-102 fibrosarcoma cells. In the same way, since only steroids were found in our *G. americana* fruit extract, it seems that in our system they are the class of molecules involved on the inhibition/activation of MAPK signaling pathways.

Finally, although further studies are considered necessary to establish the biological relevance of the effect of *G. americana* to pregnant women, the phytochemical characterization and results from proliferation/differentiation study, lead to think that steroidal compounds found in *G. americana* fruit extract seems to have an important

antitumor effect on choriocarcinoma derived cells. Nevertheless, it indicates that these substances may also cause important effects on trophoblast metabolism through MAPK pathway. The fact that the inhibition of cell growth was seen at a dose ranging 100 $\mu\text{g/mL}$, which is considered as stringent endpoint if we consider the same criteria suggested for *in vitro* tests of anti-infective potential of natural products (Cos et al., 2006), it remains a considerable concern about the implications of this medicinal plant consuming for the placental development.

The cytotrophoblast is the key cell of human placenta. This cell, of embryonic origin, is directly involved in the implantation, immune tolerance, and foetal-placental growth and development. The dynamic process of placental formation involves cytotrophoblast proliferation, migration, invasion, and differentiation by cell fusion and intercellular cooperation. A failure in one of the steps of this cytotrophoblast dynamic process is associated with some major pregnancy disorders, such as preeclampsia and intrauterine growth retardation (Alsat et al., 1999).

Therefore, alerts to the potential influence of *G. americana* in pregnancy should be considered. The interference on cell signaling pathways may lead to aberrant or adaptative placental cell turnover that could cause early termination of pregnancy, gestational pathologies, or foetal growth defects. Until now, to our knowledge, no information about *G. americana* during pregnancy was reported. As a result, that study reveals for the first time the influence of *G. americana* fruit extract on cell signaling pathway and inhibition of trophoblast-like cell growth contributing with important data in this field.

3.6. Acknowledgements

We sincerely thank Prof. Mattos Silva, L.A. and Santos, B.R. and Prof. Célio Kersul from Universidade Estadual de Santa Cruz, BA, Brazil by the botanical field work.

3.7. Legends of figures

Figure 3.1. Cell viability/proliferation effect of *G. americana* in human choriocarcinoma cell line (BeWo) measured by WST-1 colorimetric assay. BeWo cells were treated with a) different concentrations of *G. americana* (Gen) plant extract (50 to 500 $\mu\text{g/mL}$), b) plant extracts + forskolin (FKL) (50 μM) (**A**), or c) plant extract at 50 or 500 $\mu\text{g/mL}$ + MAPK inhibitors PD 98050 (PD) and SB203580 (SB) (**B**) and verified by WST-1 technique. Controls consisted of cells treated with DMSO only (CTL) (< 0.5%), hydrogen peroxide (H_2O_2) and forskolin (FKL) (50 μM). Data are representative of 3 experiments made in duplicate. Results are expressed in percentage of DMSO control cells. Statistical analysis were done using One way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison tests and Student's *t* test; * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$.

Figure 3.2. Effect of *G. americana* on trophoblast-like cell differentiation. Biochemical differentiation was verified by measuring the production of the differentiation marker, the human chorionic gonadotrophin (hCG) hormone, in the supernatant and values are expressed as mIU/mg (**A**); Morphological differentiation was measured by counting multi-nucleated cells (syncytia). A syncytium was defined as three or more nuclei (red) in the same cytoplasm without intervening surface desmosomal membrane (green) staining (**B; a-h**). The syncytium counting was performed in 5 microscopic fields per well taken randomly and results are expressed as a number of syncytium counted (**C**). All observations were performed at 20X magnification on monolayer cells. Treatment consisted of *G. americana* (Gen) plant extract or plant extract + forskolin (FKL) (50 μM). Control consisted of cells treated with DMSO only (CTL) or cells were treated with 50 μM forskolin (FKL). Data represent mean \pm SEM of 3 individual experiments made in duplicate. Statistical analysis were done using One way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison tests and Student's *t* test; * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$.

Figure 3.3. Effect of *G. americana* on differentiation cell signaling pathways. The cAMP production (A) and phosphorylation state of ERK1/2 (B and D) and p38 MAPK pathways (C and E) were analyzed after 48 h incubation. Quantification of cAMP was performed by enzymatic immunoassay. The phosphorylation of ERK1/2 and p38 and total ERK1/2 and p38 were detected by Western blot analysis. Treatment consisted of *G. americana* (Gen) plant extract or plant extract + FKL (50 μ M). Controls consisted of cells treated with DMSO only (CTL) or 50 μ M forskolin (FKL), and specific MAPK inhibitors, PD98059 (PD) (50 μ M) and SB203580 (SB) (10 μ M). Bar graph showing the densitometric analysis and the ratio between phospho-MAPK and total MAPK are performed using ImageJ 1.38x (National Institute of Health, USA). Data represent mean \pm SEM of 3 individual experiments. Statistical analysis were done using One way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison tests and Student's *t* test; * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.005 (vs CTL).

Figure 3.4. Effect of *G. americana* on ERK1/2 phosphorylation. Erk 1/2 time course activation was determined by Western blot and immunodetection for phospho-Erk 1/2 (p-p44/p-p42: form phosphorylated) and for total Erk 1/2 (p44/p42: independent of phosphorylation state). Cells were submitted to 24 h starvation, 1 h inhibition with PD98059 (A) or *G. americana* (Gen) plant extract at 50 (B), 250 (C) and 500 μ g/mL (D), and stimulation with FBS at different time point (1', 5', 10', 15', 30', 60', and 120'). Western blot analyses were done with cell lysates containing equal amounts of protein (5-10 μ g) (upper panels of blots). Bar graph shows the densitometric analysis and the ratio between phospho-ERK1/2 and total ERK1/2 using ImageJ 1.38x (National Institute of Health, USA). Time '0' represents cells submitted to inhibitor for 1 h but not stimulated with FBS. These figures are representative of at least 3 independent experiments and data are mean \pm SEM.

Figure 3.5. Effect of *G. americana* on p38 MAPK phosphorylation. p38 α MAPK time course activation was determined by Western blot and immunodetection for phospho-p38 MAPK and for total p38 α MAPK. Cells were submitted to 24 h starvation, 1 h inhibition with SB203580 (**A**) or *G. americana* (Gen) plant extract at 50 (**B**), 250 (**C**) and 500 μ g/mL (**D**), and stimulation with FBS at different time point (1', 5', 10', 15', 30', 60', and 120'). Western blot analyses were done with cell lysates containing equal amounts of protein (5-10 μ g) (upper panels of blots). Bar graph shows the densitometric analysis and the ratio between phospho-p38 and total p38 using ImageJ 1.38x (National Institute of Health, USA). Time '0' represents cells submitted to inhibitor for 1 h but not stimulated with FBS. These figures are representative of at least 3 independent experiments and data are mean \pm SEM.

Figure 3.1.

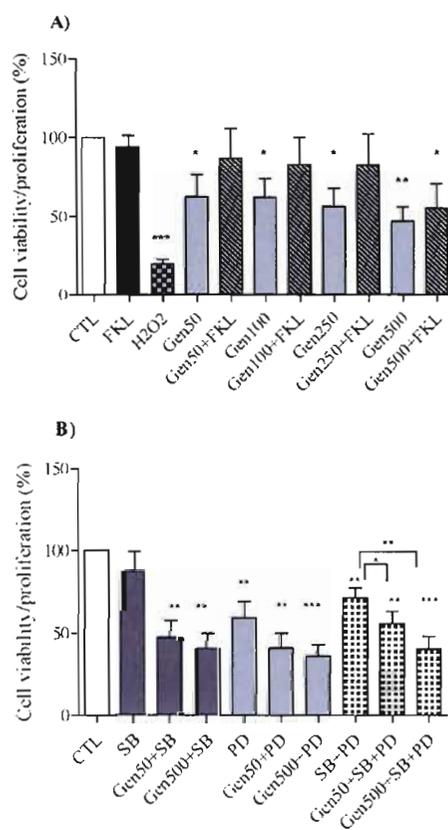


Figure 3.2.

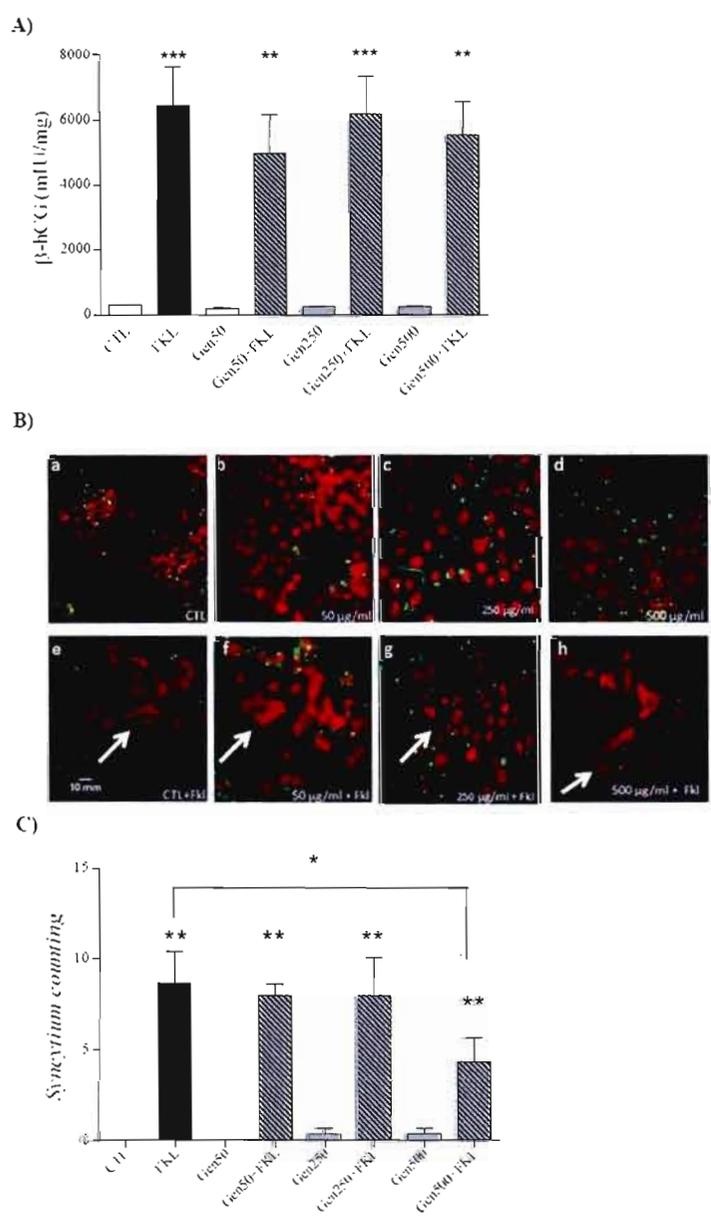


Figure 3.3.

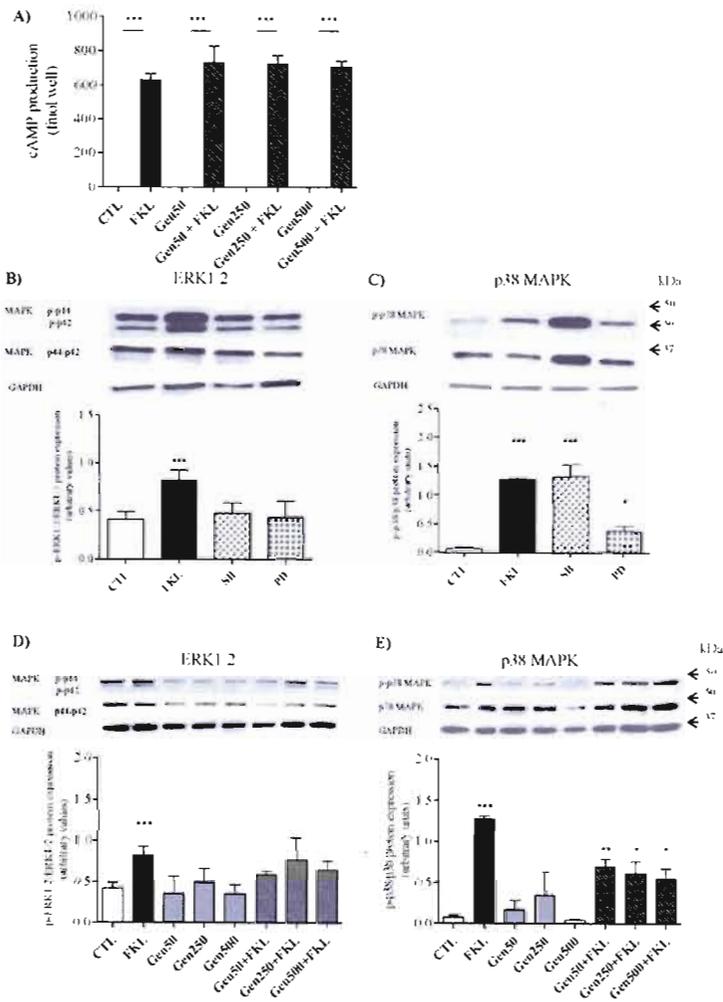


Figure 3.4.

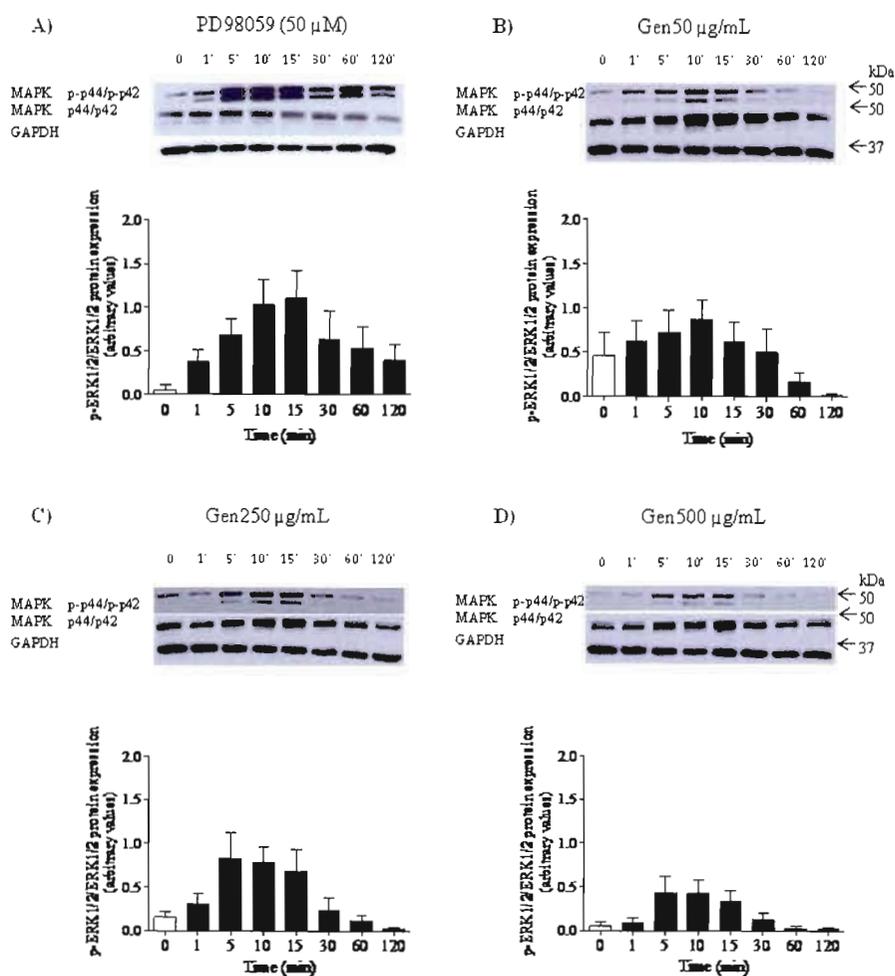
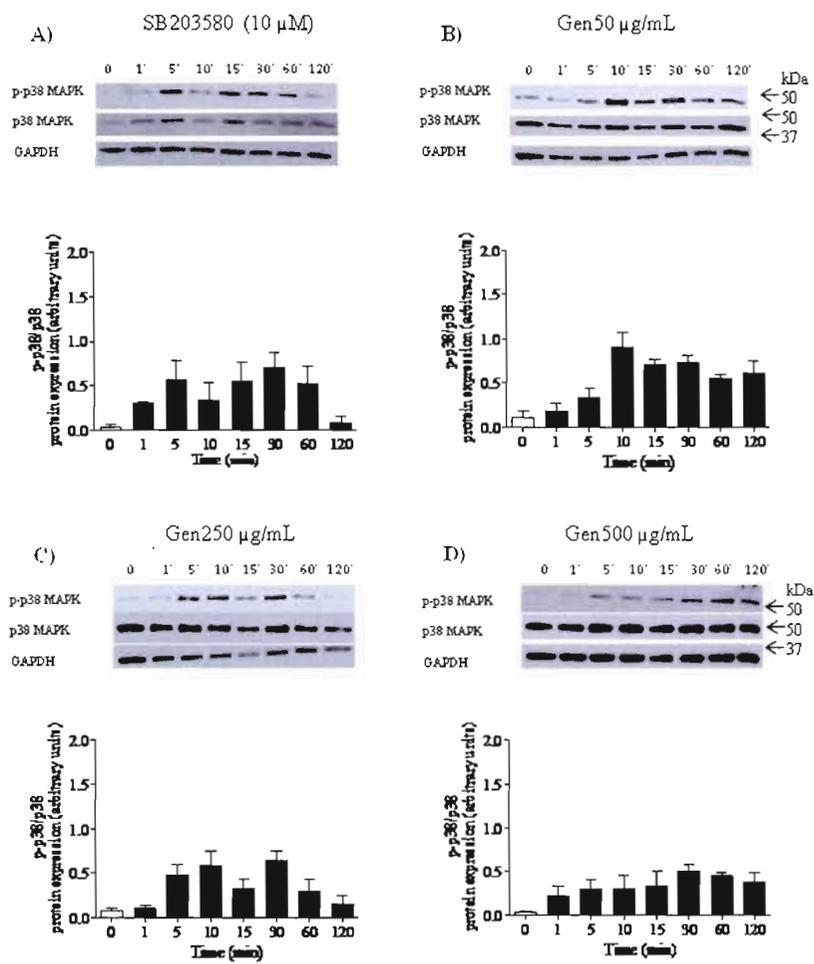


Figure 3.5.



CHAPITRE 4

TROISIÈME ARTICLE

Avant-propos

«*Lantana macrophylla* Schauer (Verbenaceae) ethanolic extract induces activation of ERK1/2 and p38 MAPK pathway and Ca²⁺ imbalance in human trophoblast derived cell lines » par Aline O. da Conceição, Fernando F. de Oliveira, Rosilene A. de Oliveira, Ademir de J. da S. Junior, Larissa Takser, Carlos Reyes-Moreno et Julie Lafond.

Les études utilisant les modèles animaux *in vivo* ont démontré la propriété de la *Lantana camara* à induire la tératogénèse. Étant donné la relation taxonomique entre *L. camara* et *Lantana macrophylla*, nous avons émis comme hypothèse que cette dernière pourrait aussi contenir des substances toxiques qui affecteraient la formation et la fonction du placenta. Ainsi, en utilisant les cellules de lignées fusigénique et non-fusigénique, respectivement BeWo et JEG-3, le but de notre travail est de vérifier l'effet de l'extrait éthanolique de *L. macrophylla* sur: 1) la viabilité cellulaire; 2) la différenciation du trophoblaste dans ses différents aspects (différenciation biochimique et morphologique, production de l'AMPc et activation des voies de signalisation) et 3) le transport du Ca²⁺ (influx du Ca²⁺ et expression génomique des transporteurs du Ca²⁺).

Pour ce travail, j'ai élaboré le design expérimental des tests biologiques, j'ai réalisé toute la partie pratique qui porte sur l'effet biologique de l'extrait de la *L. macrophylla* et j'ai rédigé l'article. Dr Fernando F. de Oliveira, Dr Rosilene A. de Oliveira et Ademir de J. da S. Junior ont assumé la collecte et l'identification du matériel végétal, la caractérisation phytochimique et la production de l'extrait éthanolique. Le Dr. Julie Lafond a assuré la conception des figures et l'analyse critique de l'article.

Dr Larissa Takser et Dr Carlos Reyes-Moreno ont réalisé l'analyse critique et les corrections de l'article. L'article a été soumis au *Journal of Food and Chemical Toxicology*.

***Lantana macrophylla* Schauer (Verbenaceae) ethanolic extract induces activation of ERK1/2 and p38 MAPK pathway and Ca²⁺ imbalance in human trophoblast derived cell lines**

Running title: *Lantana* MAPK activation and Ca²⁺ imbalance

Aline O. da Conceição^{1,2}, Fernando F. de Oliveira⁶, Rosilene A. de Oliveira⁶, Ademir de J. da S. Junior⁶, Larissa Takser⁴, Carlos Reyes-Moreno⁵, Julie Lafond^{1,2,3 *}

¹ *Laboratoire de Physiologie Materno-foetale, Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada*

² *Centre de recherche BioMed, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada*

³ *Institut Santé-Société, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada*

⁴ *Département Obstétrique Gynécologie, Faculté de Médecine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada.*

⁵ *Université du Québec à Trois Rivières, Trois Rivières, Québec, Canada*

⁶ *Laboratorio de Produtos Naturais, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, Brazil.*

* **Correspondence :** Prof. Julie Lafond, Centre de Recherches Biomédicales – Département de Sciences Biologiques. Université du Québec à Montréal C.P. 8888, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8 E-mail: lafond.julie@uqam.ca Fax: +1 514 987 67 63

4.1. Abstract

Lantana macrophylla Schauer (Verbenaceae), a medicinal plant used to treat menstrual and respiratory disorders, was investigated. The ethanolic extract from leaves was subjected to phytochemical and biological analysis. BeWo and JEG-3 cells were used to evaluate human chorionic gonadotrophin hormone (hCG) production, syncytial formation, Ca^{2+} uptake and Ca^{2+} handling protein expression. The cAMP production and the mitogen-activated protein kinases (MAPK) phosphorylation were also investigated. Phytochemical analysis yield three triterpenes: oleanolic, ursolic, and lantanolic acid. Viability assay showed no significant cytotoxic effect. A significant decrease in hCG production is observed but not a disturbance on BeWo cell fusion. The cAMP pathway was not affected by *L. macrophylla* extract alone; although the cAMP production induced by forskolin was diminished. Both ERK1/2 and p38 MAPK pathways were activated. Increased intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) was observed after 24 treatments in a time and dose dependent manner; however, only *L. macrophylla* at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ induced increased of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ after 10 min treatment. CaBP28K and PMCA1/4 were modulated at protein and mRNA levels, respectively. This study showed for the first time the effect of triterpenoids from *L. macrophylla* leaves on trophoblasts-like cells and indicates a potential toxic effect of this plant in the placental development and fetal growth.

Keywords: BeWo, JEG-3, Verbenaceae, ERK1/2, p38, Ca^{2+} uptake

4.2. Introduction

Placenta represents the intimate connection between fetus and mother during mammalian pregnancy. It allows fetus to develop, maintains the pregnancy, and is responsible for maternal-fetal exchange. The successful function of the placenta depends on events that occur during the implantation stage at the fetal-maternal interface (Hill and Longo, 1980; Saintonge and Rosso, 1983; Leiser and Kaufmann, 1994; Audus et al., 2002). One of these events is the formation of a layer of multi-nucleated cells, the syncytiotrophoblast (Boyd and Hamilton, 1966). This layer expands through intercellular fusion with underlying differentiating mononuclear villous cytotrophoblast, which is concurrently undergoing differentiation that includes decreased proliferative capacity and increased substance production (Cross et al., 1994). These substances characterize the biochemical differentiation of trophoblasts and include the production of hormones such as human chorionic gonadotrophin (hCG) and human placental lactogen (hPL) (Kliman et al., 1986; Morrish et al., 1987). The morphological differentiation of cytotrophoblasts into syncytiotrophoblast is defined by mechanisms of fusion of mononucleated cytotrophoblast cells (Midgley et al., 1963; Kliman et al., 1986).

Trophoblasts differentiation is regulated by multiple interacting signaling pathways. Some of this pathways are mitogen-activated protein kinases (MAPK), extra cellular signal-regulated kinases (ERK1/2) and the p38 enzymes (Daoud et al., 2005) and Src family of kinases (SFK), which play different roles depending of the activated member (Daoud et al., 2006; Daoud et al., 2008).

The main functions of the syncytiotrophoblast are absorption, exchanges, and specific hormonal secretion (Malassine, 2001). Syncytiotrophoblast are the primary site of fetal Ca^{2+} homeostasis regulation which includes mechanisms characterized by Ca^{2+} entry, cytosolic diffusion, and extrusion (Moreau et al., 2001; Belkacemi, 2005a; Lafond and Simoneau, 2006).

Several *in vitro* mechanisms have been used to study trophoblast differentiation (Aplin, 1991; Coutifaris et al., 1991; Al-Nasiry et al., 2006) and transfer across the placenta (Kovo et Golan, 2008). The choriocarcinoma cell lines: (a) the non-fusigenic JEG-3 cells (Kohler et al., 1971; Coutifaris et al., 1991) and (b) the fusigenic BeWo cells (Pattillo and Gey, 1968; Wice et al., 1990) are two of these models. These cells display many biochemical and morphological characteristics found in invasive trophoblasts cells (Tuan et al., 1991; Wadsack et al., 2003; Al-Nasiry et al., 2006) and they are very useful model that mimics the placental barrier (Kovo, 2008). The non-fusigenic JEG-3 cells are suitable to study Ca^{2+} transfer through placenta (Tuan et al., 1991), and BeWo cells, which upon stimulation undergo fusion, are suitable to study the trophoblast morphological and biochemical differentiation (Wice et al., 1990; Al-Nasiry et al., 2006).

Historically, plants have been an important source of natural products for human and animal health. In accordance with the World Health Organization (WHO) (2002), about 80% of people in the world use traditional medicine to overcome the poor primary health assistance in developing countries. However, due to the urban phenomenon and decrease in transmission of traditional information, it can be observed the loss of popular practices and traditional knowledge which can lead to misuse of medicinal plants (Pinto, 2006). Moreover, studies are still scarce and knowledge about biological activity of plants commonly used in traditional medicine or species diversity are limited. After all, since plant metabolites are chemicals similar to those in purified medications, they have the same potential to induce serious adverse effects (Marcus and Snodgrass, 2005). This aspect should be carefully investigated, especially during pregnancy when the safety of the fetus can be threatened.

Thus, *Lantana macrophylla* Schauer (“Camabará-de-folha-grande”) (Verbenaceae), a medicinal plant used to treat menstrual and respiratory disorders (2009) native from South America Atlantic Forest, was selected for investigation. This plant belongs to the widespread genus *Lantana* that is constituted of an estimated number of 150 species (Ghisalberti, 2000) being mostly native to subtropical and tropical America, although few taxa can be found in tropical Asia and Africa (Munir, 1996). A well know species named *L. camara* L. is known as a weed used as a garden plant and as a medicinal plant in folk medicine (Ghisalberti,

2000). Although it medicinal usage, *L. camara* is also recognized for its toxicity associated to livestock poisoning (Sharma et al., 1981b, Sharma et al., 1988b; Ganai and Jha, 1991) and teratogenic effects (Mello et al., 2005). This toxicity is attributed to oleane-type triterpenes - the lantadenes - which can induce liver and kidney dysfunction (Sharma et al., 1981a; Sharma et al., 1988a). Until now, no data is available in relation to phytochemical analysis or biological effect of *L. macrophylla*. Thus, in the present study, we report the identification of three triterpenoids from ethanolic extract of *L. macrophylla* leaves and the effect of this extract on *in vitro* mechanisms of trophoblast-like cells differentiation and Ca^{2+} transport.

4.3. Material and methods

4.3.1. Plant material

Lantana macrophylla Schauer (Verbenaceae) was collected through botanical field work in August 2006, in Ilhéus, state of Bahia, Brazil. The voucher specimen were identified and deposited in the herbarium of the Universidade Estadual de Santa Cruz under identification number 55 674. The collection of plant material was followed by separation and measurement. Thus, 201,91 g of dried and powdered plant material (leaves) were macerated in 2 L of ethanol for 24 to 48 h under sporadic agitation. The marc was evaporated to dryness under reduced pressure and the plant material was soaked in recovered solvent once more to make a new extraction. This procedure was repeated 12 times resulting in an ethanolic extract (35,7 g) characterized by a dark-brown color and strong odor.

4.3.2. Phytochemical analysis

The ethanolic extract was subjected to column silica gel chromatography fraction followed by thin layer chromatography analysis. Thus, the different fraction groups were subjected to chemical analysis and characterization through chemical and physical properties. Compounds were structurally identified by IR, UV, and uni and bidimensional ^1H -nuclear magnetic resonance (NMR) and ^{13}C -NMR spectroscopy and compared with those of analogues reported in the literature (Mahato, 1994; Siddiqui et al., 1995; Carvalho, 2001; David, 2001).

4.3.3. Plant material preparation

For biological tests, the ethanolic extract from *L. macrophyla* was initially solubilized at 100 mg/mL in 100% sterile dimethyl sulfoxide (DMSO). A stock solution of 5 mg/mL in Ham's-F12 medium (Gibco®, Montréal, CA) or modified Eagle medium (MEM-Gibco®, Montréal, CA) was prepared, filtered in 10 μm membrane filters, distributed in aliquots, and stored at -20°C until use. Immediately before biological tests, different concentrations of the extract ranging from 1 to 100 $\mu\text{g/ml}$ were prepared using Ham's F-12 medium or MEM supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) to proceed biological tests.

4.3.4. Cell lines

The human placental choriocarcinoma cell line, JEG-3 (ATCC - HTB-36 Manassas, VA, USA) cells and BeWo (ATCC - CCL-98 Manassas, VA) cells were used to perform the biological assays. Cells were maintained in Ham's F-12 or MEM, respectively, supplemented with 10% FBS in 5% CO_2 at 37°C . For all tests, control consisted of cells treated with DMSO ($<0,01\%$; v/v). Cells were used for different proposes: JEG-3 cells were used to investigate the events related to Ca^{2+} transport by trophoblasts cells, while BeWo cells were used to evaluate the effect of plant extract on cell differentiation. To induce the differentiation state in BeWo cells, 50 μM of forskolin α -(methylamino) isobutyric acid (FKL) (Sigma-Aldrich, Canada) were used and tests were done after 48 hours of incubation.

4.3.5. Cell viability/proliferation

The cell viability/proliferation procedure was done seeding 10^3 cells/well in 96 well plates. After 24 h seeding, cells were treated with different extract dilution and/or 50 μ M of FKL for 48 hours. Controls consisted of cells treated with DMSO only and hydrogen peroxide (H_2O_2 , 30% solution; Sigma-Aldrich, Canada) at 50 μ M, an oxidative stress inducer (Heazell et al., 2009). Cell viability/proliferation was determined by the WST-1 based colorimetric assay (Roche Applied Science, Laval, Canada). For that, WST-1 reagent was added to the cells treated for 48 h and incubated at 37°C and 5% CO_2 . After 4 h incubation, the absorbance was measured with a wavelength of 450 nm using a reference wavelength of 655 nm. Also, microscopic analysis was done by inversed light microscopic in order to observe cell morphological appearance and confluence.

4.3.6. hCG production

For hCG release detection, BeWo cells were seeded in 24 well plates at a density of $4,5 \times 10^4$ /well. After 24 h seeding, cells were treated with 1-100 μ g/mL of the ethanolic extract with or without 50 μ M of FKL. After 48 h of treatment, the influence of plant extract on hCG production in the supernatant was measured using ELISA kit (DRG®, Germany) which detects the β chain of the hCG molecule. Conditioned media were harvested, centrifuged, and frozen at - 20°C. For β -hCG dosage, 50 and 200 fold diluted samples were used and the technique was performed following manufacturer's instructions. The optical density was determined using 570 nm wavelength and sample values were established from a standard curve.

4.3.7. Morphological evaluation of trophoblast differentiation by immunofluorescence assay

For morphological differentiation assay, BeWo cells were seeded at $4,5 \times 10^4$ cells/well of density in 24 well plates. After 24 h seeding, cells were treated with 1-100 μ g/mL of the ethanolic extract with or without 50 μ M of FKL, or DMSO only. After 48 h of treatment, BeWo cells were stained with anti-desmosomal antibody in order to see the syncytium formation. The technique was described by Daoud et al., (2005) with some

modification. Cells were washed twice with phosphate buffer saline (PBS), fixed in methanol at -20°C for 10 min, washed again with PBS (three times), and then incubated in PBS containing 2% FBS (v/v) for 45 min, to eliminate non-specific binding. Thereafter, cells were rinsed with PBS and incubated in the presence of mouse anti-human antidesmosomal monoclonal antibody (1/700) in PBS containing 0.2% BSA for 1 h at room temperature. After being washed three times with PBS, cells were incubated with Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (1/1000) for 1 h at room temperature in the dark. For nuclear staining, cells were incubated with propidium iodide (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for an additional 30 min at room temperature in the dark, washed three times with PBS, and viewed using a Nikon Eclipse TE300 camera (Nikon, Tokyo, Japan) equipped with a confocal laser-scanning microscope (Bio-Rad MRC1024, CA, USA). All observations were performed at 20X magnification on monolayer cells. A syncytium was defined as three or more nuclei in the same cytoplasm without intervening surface desmosomal membrane staining. The syncytium counting was performed in 5 microscopic fields per well taken randomly.

4.3.8. cAMP measurement

To evaluate the interference of the extract on adenosine 3',5'-cyclic monophosphate activation, BeWo cells (5×10^4 cells/well) were cultured in 96-well microplates and incubated overnight at 37°C (5% CO_2 and 95% humidity). After 24 h seeding, the medium was aspirated and 100 μL of FKL and/or plant extract (1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were added to cell cultures. After 5 min of incubation, culture media was aspirated and cells were washed three times with cold ($4-8^{\circ}\text{C}$) PBS. Then, after adding 250 μL of Cell Lysis Buffer (supplied by manufacturer) at each well, cells were submitted to freeze/thaw three times. The resuspended cells were centrifuged at $600 \times g$ for 10 minutes at 4°C to remove cellular debris, distributed in aliquots and stored at -20°C until use. The intracellular cAMP measurement was performed using the ParameterTM cAMP assay (RandD Systems, Minneapolis, MN, USA) following manufacturer's instructions. Briefly, 50 μL of Primary Antibody Solution was added in all wells except into two wells designated NSB (to background subtraction). The plate was incubated for 1 h at room temperature on a horizontal orbital microplate shaker set at 450 rpm. After this period of time, the solution was aspirated and wells were washed 4 times with

Wash Buffer (400 μ L). Then, 100 μ L of standards and samples were added into each well, followed by addition of 100 μ L of Cell Lysis Buffer, and 50 μ L of cAMP Conjugate to all wells. After a time period incubation of 2 h at room temperature on the shaker, wells were once again aspirated and washed as described before. Substrate Solution (200 μ L) was applied into each well and the plate was incubated for another 30 min at room temperature on the bench top and protected from light. The reaction was stopped by pipetting 100 μ L of Stop Solution into each well. The optical density was determined using 450 nm wavelength values subtracted from 570 nm wavelength. Samples values were established from standard curve.

4.3.9. Trophoblast differentiation/proliferation cell signaling pathway

ERK1/2 and p38 phosphorylation was used to analyze the effect of *L. macrophylla* extract on trophoblast differentiation cell pathway. For that, cells were seeded in 9.2 cm² Petri plates (1.8 x 10⁵ cells/plate) and incubated for 24 h in 5% CO₂ and 95% humidity. Then, cells were treated with (a) MAPK inhibitors, PD98059 (50 μ M), or SB203580 (10 μ M); (b) plant extract (1-100 μ g/mL) with or without FKL (50 μ M); (c) FKL (50 μ M); and (d) DMSO only (concentration of vehicle present in PD98059/SB203580 treated cells <0.1%). Doses of MAPK inhibitors were established by dose-dependent tests (data not shown) and literature reference (Daoud et al., 2005). After 48 h incubation, cells were harvested to perform Western blot technique.

Also, in order to verify the rapid activation of BeWo cells, in the same way described above, cells were seeded in 9.2 cm² Petri plates. When achieving 50% of confluence, cells were incubated at 37°C with Ham's-F12 without serum for 24 h. After that, cells were washed with PBS (37°C) for three times and they were incubated again with Ham's-F12 without serum for 2 h. Then, cells were treated with specific MAPKinase inhibitors, PD98059 (50 μ M) and SB203580 (10 μ M), plant extract (1-100 μ g/mL), and DMSO only (CTL), for 1 h. All treatments were done in serum free medium. Then, cells were harvested (time Zero) or stimulated with medium containing 20% serum to give a final volume of 10% FBS for 10 min.

For protein preparation, medium were aspirated, cells were rinsed twice with ice-cold PBS, solubilized with ice cold RIPA buffer [10 mM Tris/HCl, pH 7.4; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1mM EGTA; 1% Triton 100; 100 mM sodium fluoride; 10 mM sodium pyrophosphate; 2 mM sodium orthovanadate (w/v)] supplemented with Complete Mini Protease inhibitor cocktail (Roche Applied Scientific, Laval, Canada) following the technique described by Yoshimura et al. (1987) in which cell lysates are clarified by centrifugation at 14 000 g for 10 min at 4°C. The cellular protein content of each well was evaluated by spectrophotometric quantification using bicinchoninic acid protein assay (BCA) reagent (Pierce, Rockford, IL, USA) composed with 25 v. solution A, 24 v. solution B, and 1 v. of solution C, with bovine serum albumin (BSA) as standard.

For the electrophoresis, equal amount of proteins (typically 15 µg) were solubilized in sample buffer (RIPA) and resolved in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (SDS-PAGE). Proteins were electrotransferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (1.7 mA/cm²) (Millipore, Cambridge, ON). The membranes were blocked with 5% bovine serum albumin (w/v) in Tris-Buffered Saline-Tween 20 (TBS-T) [10 mM Tris/HCl pH 7.6; 150 mM NaCl; 0.05% Tween 20 (v/v)] for 30 min at room temperature. Membranes were then incubated overnight at 4°C with primary antibodies: anti-phospho-ERK1/2 (1/1000, Cell Signaling, Beverly, MA, USA) and anti-phospho-p38 (1/1000, Cell Signaling, Beverly, MA, USA) in TBS-T/5% BSA. Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) rabbit mAb detects endogenous levels of p44 and p42 MAP Kinase (Erk1 and Erk2) when dually phosphorylated at Thr202 and Tyr204 of Erk1 (Thr185 and Tyr187 of Erk2), and singly phosphorylated at Tyr204. This antibody does not cross-react with the corresponding phosphorylated residues of either SAPK/JNK or p38 MAP kinase. Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) antibody detects endogenous levels of p38 MAPK only when activated by phosphorylation at Thr180 and Tyr182. This antibody does not cross-react with the phosphorylated forms of either p42/44 MAPK or SAPK/JNK. It also reacts with p38 singly phosphorylated at Thr180 and singly phosphorylated at Tyr182. After overnight incubation, membranes were washed three times with TBS-T, and probed with secondary antibodies (1/2500 for anti-rabbit-IgG, Cell Signaling, Beverly, MA, USA) for 2 h at room temperature.

Blots were washed three times with TBS-T and the detection was performed using the BM chemiluminescence system (Roche Applied Scientific, Laval, Canada) and visualized by autoradiography. After stripping with 0.2 M glycine, 0.5 M NaCl, pH 2.5, membranes were similarly stained with anti-ERK1/2 (1/1000, Cell Signaling, Beverly, MA, USA) and anti-p38 (1/1000, Cell Signaling, Beverly, MA, USA; p38 MAPKinase antibody detects endogenous levels of total p38 α , - or - γ MAPK protein). This antibody does not recognize p38, JNK/SAPK or p44/42 MAPK). After overnight incubation, membranes were washed three times with TBS-T, and probed with secondary antibodies (1/2500 for anti-rabbit-IgG) for 2 h at room temperature. Mouse anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH – 36 KDa, 1:5000 in TBST-5% BSA, Chemicon, Temecula, CA) and HRP-conjugated goat anti-mouse-IgG (1:10000 in TBST-5% milk, Chemicon, Temecula, CA) as the second antibody were used to normalize the protein amount. Quantification was carried out by digitizing the images with a computer-based image analysis system and measuring the band intensities in grey-scale pixel values (Image J 1.38x, National Institutes of Health, USA).

4.3.10. Ca²⁺ uptake

In order to evaluate the total cell Ca²⁺ incorporation, radiolabeled Ca²⁺ (⁴⁵CaCl₂, MP/ICN Biochemicals - Irvine, CA, USA) was used. JEG-3 cells were seeded at 2.5x10⁵ of density/well in 24 well plates. After 24 h seeding, cells were treated with *L. macrophylla* (1-100 μ g/mL), 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃, 0,5 nM and 100 nM), vehicle (ethanol or DMSO), or FKL (50 μ M). Subsequently, after 24 h of treatment cells were washed twice with 500 μ L of Hank's balanced salt solution buffer containing 1.26 mM of CaCl₂ and 0,1% BSA (HBSS 1,26 mM-BSA) and incubated at 37°C with 250 μ L of this same solution for 10 min to stabilize. Then, HBSS 1,26 mM-BSA containing ⁴⁵CaCl₂ (5 Ci/well) was applied to each well. After different time points varying from 0 to 20 min, the incubation was stopped and cells were washed three times with 1 mL of cold phosphate buffer saline (PBS) (4°C) containing 4 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA). Cells were then solubilized in 500 μ L of 0.5 M NaOH, and ⁴⁵Ca²⁺ cell-associated radioactivity was measured by a β -scintillation 1.400TM counter (PerkinElmer Inc., USA). The cellular protein content

of each well was evaluated by spectrophotometric quantification using BCA reagent (Pierce, Rockford, IL, USA) with BSA as standard.

Also, in order to verify the effect of *L. macrophylla* on channels from the cell surface membrane, confluent JEG-3 cells cultures (48 h) were washed and let to stabilize as described above. Then, cells were treated with HBSS 1,26 mM-BSA (CTL) or the same HBSS containing $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (200 μM), RuR (10 μM), or *L. macrophylla* (1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 10 min. Then, cells were treated with HBSS 1,26 mM-BSA- $^{45}\text{CaCl}_2$ (5 Ci/well) for 0, 0,5 min and 1min. The incubation was stopped and proteins were harvested as described above.

4.3.11. Effect of *L. macrophylla* on Ca^{2+} transport protein expression

To measure Ca^{2+} transport protein expression, JEG-3 cells were seeded at an initial density of 2.5×10^5 cells/well in 24 well plates. After 48 h seeding, 60% confluent cells were treated with *L. macrophylla* (1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), $1\alpha,25\text{-Dihydroxyvitamin D}_3$ ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, 100 nM), vehicle (DMSO), or FKL (50 nM). Then, after 24 h treatment, confluent JEG-3 cell, were harvest and total protein and RNA were extracted using specific techniques. Protein extraction and detection were done using RIPA buffer and the technique described in the previous sections. For protein detection, rabbit anti-histamine releasing factor (HRF)/TCTP IgG (23 KDa) (1:500 in TBS-T 1% BSA – Medical and Biological Laboratories, Japan), mouse anti-PMCA1/4 IgG (140 KDa) (1:1000 in TBS-T 5% BSA – Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz - CA, USA), anti-CaBP28K (1:500 in TBS-T 3% BSA, Abcam Inc., Cambridge, MA, USA) was used overnight at 4°C. Rabbit anti-TRPV-6 (1:500 in PBS 1% BSA and 1% powdered milk – Alomone Labs Ltd, Jerusalem, Israel) was used for 2 h. All western blot reactions were followed by addition of horseradish peroxidase (HRP) anti-rabbit-IgG conjugated (1:2500 TBST-5% powdered milk, Cell Signaling, Chemicon, Temecula, CA, USA) or goat anti-mouse-IgG HRP-conjugated (1:5000 TBST-5% powdered milk, Chemicon, Temecula, CA, USA) for 1 h at 20–25°C as second antibodies. The membrane was detected using the enhanced chemiluminescence (ECL – Roche Applied Science, Laval, CA, USA) protocol. After stripping with 0.2 M glycine, 0.5 M NaCl, pH 2.5,

the membrane was similarly stained with mouse anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH – 36 KDa, 1:5000 in TBST-5% BSA, Chemicon, Temecula, CA, USA) antibodies. Goat anti-mouse-IgG HRP-conjugated (1:10.000 in TBST-5% powdered milk, Chemicon, Temecula, CA, USA) was used as the second antibody. Quantification was carried out by digitizing the images with a computer-based image analysis system and measuring the band intensities in grey-scale pixel values (Image J 1.38x, National Institutes of Health, USA). Western blot results were normalized to GAPDH expression.

To perform the analysis of mRNA expression, the total RNA were extracted using RNeasy mini-kit (Qiagen, Mississauga, Canada). Total RNA (1 µg) were reverse transcribed and the Real-time PCR reaction was performed using a Light Cycler System (Roche Science, Laval, CA). PCR were carried out with LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche Science, Laval, CA) using 10 mM of each primer (TCTP sense 5'-TGTTCTCCGACATCTACAAGATCC-3';

anti-sense 5'-TTCTGTCCTACTGACCATCTTCC-3';

PMCA1 sense 5'-CAGCAGGAGAACCAGAACCA-3';

anti-sense 5'-ATTCCAGCCCTCTGACACTT-3';

PMCA4 sense 5'-TCAGGAATCCAACGGTG-3';

anti-sense 5'-TCGATGACAGTGCGTACC-3';

TRPV6 sense 5'-TCTGCGGACGGGAGTATGG-3';

anti-sense 5'-CCTGTGCGTAGCGTTGGA-3') (Operon Qiagen, Seattle, WA), and 1 µL of cDNA samples in a total volume of 10 µL. The ribosomal gene 18S (sense 5'-CGCCGCTAGAGGTGAAATTC-3'; anti-sense 5'-TTGGCAAATGCTTTTCGCTC-3') was used as reference gene to quantify the expression of the target genes. The CaBP28K gene expression was not performed because in prior experiments we could not obtain detectable amount of its mRNA (data not shown). Amplification conditions were: 5 minutes at 95°C,

followed by 55 cycles with 5 s at 95°C and 10 s at 58-60°C and 10 s at 72°C. The relative quantification was done by the comparative method of relative quantification.

4.3.12. Statistical analysis

Paired *t* test, and One-way ANOVA followed by Tukey's test were used. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com.

4.4. Results and discussion

L. macrophylla for which no prior study have been reported was herein selected for chemical and biological investigation. Phytochemical studies undertaken on different species of the genus *Lantana* resulted in the isolation of flavonoids and triterpenes (Wollenweber, 1997), iridoids (Pan et al., 1992), diterpenes (Sharma et al., 2008), and glycosides (Ahmed et al., 1972; Taoubi et al., 1997). The present study was undertaken on the chemical constituents of the ethanolic crude extract from the leaves of *L. macrophylla* and resulted in isolation and elucidation of three triterpenoids: lantanolic acid, ursolic acid, and oleanolic acid (figure 4.1). From the leaves of *Lantana* species, different compounds were isolated: steroids from *L. camara* (Sharma et al., 1983); flavones and phenylpropanoids from *L. trifolia* (Juliao et al., 2009a); and glycosides from *L. fucata* (Juliao et al., 2009b). None of them were found in the specimen used in our study. Thus, the presence of these only three triterpenoids demonstrates the peculiarity inherent of the *L. macrophylla* as part of the *Lantana* species complexity (Love et al., 2009), which reflects its different habitats and ethno pharmacological variety.

Thus, to study the effect of *L. macrophylla* on placental development and function, we used two *in vitro* models: JEG-3 and BeWo cell lines. First, the cell viability/proliferation was assessed using WST-1 solution and microscopic examination in both cell lines. The results showed that even at high doses, *L. macrophylla* fruit extract did not affect the viability of JEG-3 cells (figure 4.2A). However, it was observed a reduction of 25% on BeWo cell growth. Nevertheless, despite the fact that *L. macrophylla* caused a reduction on BeWo cell growth, by the microscopic analysis, cells did not show any morphological alteration or abnormal presence of dead cells in the supernatant under physiological doses ($\leq 100 \mu\text{g/mL}$). Also, hydrogen peroxide at $50 \mu\text{M}$, confirmed the susceptibility of choriocarcinoma cell lines to the oxidative stress which result in a significant decrease in cell viability/proliferation in opposite to FKL ($50 \mu\text{M}$), a differentiation inductor, which does not interfere on cell viability. Hence, we can state that *L. macrophylla* is not highly cytotoxic for the choriocarcinoma cell lines studied here. It is important to note that the difference related to fusigenic capacity may play a role in their response to different doses and treatments. As already observed by Al-Nasiry et al. (2006), even though both cell lines are from the same

origin, the results found for one cell type cannot be applied exactly to the other cell type. Additionally, even though with our protocol we cannot establish the difference between cell death, apoptosis or decreased proliferation, the absence of morphological changes led us to think that the reduction of 25% of BeWo cells could be related to an anti proliferative property of triterpenes found in *L. macrophylla* which is extensively described in the literature (Liu, 1995; Shishodia et al., 2003; Pathak et al., 2007; Shan et al., 2009; Xavier et al., 2009).

Next, we observed the biochemical and morphological differentiation of trophoblast-like cells in order to access the effect of *L. macrophylla* on placental development (figure 4.3). For that, we used the fusigenic BeWo cell line from which we measured the differentiation marker hCG hormone and the syncytial formation. Results showed that the plant extract alone or in combination with FKL led to significant decrease in hormone levels comparable to the p38 inhibitor SB203580 (figure 4.3A). However, this extract did not induce morphological differentiation or interfered on FKL cell fusion at any concentration (figure 4.3B and 4.3C). Therefore, since biochemical and morphological differentiation of trophoblasts are orchestrated by independent multiple interacting pathways (Daoud et al., 2005; Daoud et al., 2006; Daoud et al., 2008), these results suggest that *L. macrophylla* compounds may have an effect on specific and autonomous pathway of trophoblasts differentiation related to hCG production but not in the morphological differentiation pathway.

The cAMP is a ubiquitous second messenger which pathway has been extensively used to induce BeWo cells *in vitro* model differentiation (Novak et al., 2006; Egawa et al., 2008; Vargas et al., 2008). When activated exogenously by FKL, this molecule is converted from adenosine triphosphate (ATP) via adenylyl cyclases (Wice et al., 1990; Kudo et al., 2003). Consequently, in order to verify if this cell pathway could be implicated on *L. macrophylla* effect, we investigated the cAMP production from cells treated with *L. macrophylla* ethanolic extract with or without FKL (figure 4.4A). The results confirmed the activation of cAMP pathway by FKL differentiated BeWo cells and indicated that *L. macrophylla* alone does not lead to cAMP production. However, in a combined treatment of

L. macrophylla and FKL, even though not statistically significant, we could observe a decrease on cAMP production by FKL with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (2-fold), 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1,4-fold), and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1,25-fold). These results show that it may exist a dose dependent association with the diterpenoid forskolin that may affect the production of cAMP but is not enough to cause BeWo morphological differentiation.

Then, the ERK1/2 and p38 MAPK signaling pathways were investigated (figure 4.4B to 4.4E). We first detected the phosphorylation state of MAPK after 48 h (figure 4.4B and 4.4C) incubation that represents in our system the time in which BeWo undergoes syncytial formation under differentiation stimulation. Results showed that both ERK1/2 and p38 were strongly activated by FKL after 48 h incubation. Conversely, BeWo cells treated with MAPK inhibitors PD98059 and SB203580 presented ERK1/2 activation nearby the basal level (CTL) and significant activation of p38 MAPK. Interestingly, cells treated with different concentrations of *L. macrophylla* extract showed to activate strongly ERK1/2 and p38 after 48 h of incubation. Also, FKL and *L. macrophylla* combined treatment led to the same level of activation or to a synergistic activation of both pathways when compared to FKL alone. It is worth to note that some treatments induced also the production of total forms of ERK1/2 (SB203580, LAN 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and p38 (LAN 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) which may be related to a regulation at gene expression level.

The rapid activation of MAPK in response to mitogens in various cell lines has implicated these kinases in the control of cell proliferation (Rubinfeld, 2004). So, in order to analyze the influence of different treatments on inhibition and rapid reactivation of ERK1/2 and p38 MAPK, after 24 h of starvation, we submitted cells to 1 h inhibition (time zero) with MAPK inhibitors or *L. macrophylla* followed by FBS stimulation for 10 min (figure 4.4D and 4.4E). After starvation period, the ERK1/2 analysis of BeWo cells showed a basal phosphorylation of this MAPK (time 0, CTL) that was increased upon FBS stimulation (10 min, CTL) (figure 4.4D). Also, the results showed the inhibition of ERK1/2 MAPK phosphorylation after 1 h treatment with PD98059 followed by a relatively sustained (less intense reactivation) after 10 min stimulation with FBS. The different *L. macrophylla* treatments applied to these cells showed a dose-dependent response characterized by a)

phosphorylation levels of ERK1/2 similar to normal levels at 1 $\mu\text{g/mL}$, b) a slight inhibition of the phosphorylation followed by reactivation similar to normal level at 10 $\mu\text{g/mL}$, and c) a strong activation followed by an increased phosphorylation by FBS at 100 $\mu\text{g/mL}$ (figure 4.4D). These results showed clearly that *L. macrophylla* compounds potentially induce the phosphorylation of ERK1/2 and that this activation is persistent during the time (48 h).

In relation to p38 MAPK, the activation of this cell pathway showed a specific pattern in BeWo cells (figure 4.4E). A very weak basal level of p-p38 and reactivation of p38 was seen after 24 h starvation. On the contrary, the inhibition of p38 MAPK by SB203580 induced a strong reactivation of p38 after 10 min stimulation with FBS. This effect has been observed in BeWo cells in our laboratory (data not published) and the reasons for p38 activation by SB203580 are not clear. However, considering the MAPK pathway described in the literature, this activation could be due to compensatory mechanism which results in activation of Mixed lineage kinase-3 (MLK-3)-dependent mechanism pathway (Muniyappa and Das, 2008) and/or indirectly activation of other isoforms of p38 that do not respond to SB203580 inhibition (Lee et al., 1994; Cuenda et al., 1995).

Results from *L. macrophylla* were similar to the inhibitor SB203580 in which a strong reactivation of phosphorylation was seen. Curiously, an opposite effect to ERK1/2 MAPK (figure 4.4D and 4.4E) can be remarked in which the lower dose (1 $\mu\text{g/mL}$) allowed a higher reactivation by FBS and the higher dose (100 $\mu\text{g/mL}$) allowed less important reactivation of this MAPK and may represent the signaling intersection and cross-talk between p38 and ERK1/2 in attempt to coordinate the cell proliferation (Sharma et al., 2003).

Taking all together, the results presented here indicate that the mixture of triterpenes from *L. macrophylla* does not cause cell morphological alteration; however, the activation of ERK1/2 and p38 MAPK pathways seem to be implicated in the diminished cell viability/proliferation and hCG production by the BeWo cell line.

Additionally, the hCG is a glycoprotein hormone comprising 2 subunits - α and β - joined non covalently. This hormone exists in multiple hormonal agents that present different

physiological functions and are produced at different levels depending on the gestational state. These molecules are regular hCG, hyperglycosylated hCG, and the free β -subunit of hyperglycosylated hCG (hCG free β) being the later related to cancer cell growth and malignancy (Cole, 2009). Our results are not conclusive neither it was our objective to establish the antitumor activity of *L. macrophylla*. However, the results obtained from hCG detection, regulation of cell signaling pathways, and the antitumor property reported for oleanolic and ursolic acids (Liu, 1995) may suggest that the *L. macrophylla* compounds could affect BeWo cells through decreasing its tumorigenic property.

As a second part of this study, we verified the effect of *L. macrophylla* on the differentiation related trophoblasts function, the Ca^{2+} transport. For that, Ca^{2+} uptake kinetics experiments and Ca^{2+} transport proteins and mRNA expression analysis were performed in JEG-3 cell line after 24 h treatment. Results showed that FKL treated cells demonstrated the likely effect (Fray and Park, 1986; Park et Kim, 1996) with a significant increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ being more significant at the plateau stage (up to 10 min) (figure 4.5A). This effect is related to the IP3-mediated $[\text{Ca}^{2+}]_i$ store mobilization (Dai et al., 2008) by FKL and its direct action on voltage-sensitive calcium channels (VSCCs) (Park et Kim, 1996).

On the contrary, no significant effect on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was seen on JEG-3 subjected to $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (figure 4.5B). Such effect was unexpected since $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ is known to increase CaBP28K expression in JEG-3 cells (Belkacemi, 2005b). Nevertheless, this lack of increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ can be explained by an independent epigenetic repression of VDR gene expression and activity in choriocarcinoma cell lines described by Pospeschova et al. (2009), which interferes directly on the Ca^{2+} influx and not on gene regulation by $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

The rise on Ca^{2+} influx by oleanolic acid (Aminin et al., 1999; Lee et al., 2007) and ursolic acid (Lauthier et al., 2000) has been reported in the literature. Interestingly, in our study, the effect of *L. macrophylla* on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was highly significant and differed between concentrations and in relation to time of the kinetic curve (figure 4.5C to 4.5E). The lower dose caused a significant increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ at the beginning (1 min) and later time (15 min) of the kinetic curve. The 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dose showed to have an effect only at 5 min of the kinetic

curve while 100 $\mu\text{g/mL}$ presented an effect on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ at an earlier time point and at a later time point (15 min). It is important to note that 100 $\mu\text{g/mL}$ showed a switch in relation to 1 $\mu\text{g/mL}$, in which it was seen a high uptake of Ca^{2+} at 15 min.

Therefore, we verified the Ca^{2+} uptake due to the direct effect on cell surface channels (figure 4.6). For that, confluent JEG-3 cells were treated for 10 min, where the Ca^{2+} uptake is likely to depend mainly on membrane transfer (Moreau et al., 2002a). Results showed that JEG-3 cells submitted to 10 μM of RuR had a significant increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ opposing to the blockage on Ca^{2+} entry by 200 μM of CoCl_2 (figure 4.6). Both results confirm the functionality of voltage-gated channels (Cibulsky and Sather, 1999; Bernucci et al., 2006) and store-operated Ca^{2+} channels (Clarson et al., 2003) in trophoblast cells.

The effect of triterpenoids on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ has been reported in the literature. Reports show the involvement of these substances in regulation of mitochondrial voltage-dependent anion channels (VDAC) and inhibition of the Ca^{2+} -induced mitochondrial permeability transition (Tang et al., 2005; Gao et al., 2006). As well, it has been described the inhibition of various K^+ -channels that selectively facilitate Ca^{2+} -influx via L-type Ca^{2+} channels and increase the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ by triterpenes (Shi and Li, 2007).

The results obtained from *L. macrophylla* treatment after 10 min incubation showed a significant increase on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ for 10 $\mu\text{g/mL}$ only and indicate that, at a critical concentration, *L. macrophylla* compounds mixture can facilitate the Ca^{2+} entry in trophoblast cells through direct interaction with Ca^{2+} channels present in the cell surface. Moreover, this interaction seems to be unstable and mixture solubility dependent, since different effect is seen when JEG-3 is incubated for 24 h with different doses of this plant extract.

Thus the influence of *L. macrophylla* compounds on increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was clearly demonstrated. Next, to verify if the influence of *L. macrophylla* was due to gene regulation, we investigated the placental Ca^{2+} channel transporters and buffer proteins expressed in the JEG-3: TRPV-6, TCTP, CaBP28K, and PMCA1/4 (figure 4.7). Results obtained from Ca^{2+} protein expression under different treatments showed that, in spite of the significant protein

expression of the CaBP28 by $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and *L. macrophylla*, no other Ca^{2+} transport component was affected by *L. macrophylla*. Unfortunately, due to technique limitations and the great variability of expression of the different Ca^{2+} transport system genes tested in JEG-3 cells, results from TRPV-6, and TCTP mRNA expression were not conclusive. Nevertheless, RNA expression of PMCA 1 and 4 showed to be upregulated after 24 h of *L. macrophylla* treatment (figure 4.8) which is more evident up to $10 \mu\text{g/mL}$.

Little is known in regards of placental intracellular machinery that maintains Ca^{2+} homeostasis: however, studies suggest that Ca^{2+} -binding proteins (CaBP) play a cardinal role in regulating or shuttling Ca^{2+} in intracellular medium (Lafond and Simoneau, 2006) as well it is related to the TRPV-6 channels activity (Hoenderop et al., 2005). The TRP superfamily of channels function of store operated channels (SOC) promotes the Ca^{2+} influx in nonexcitable cells (Lafond and Simoneau, 2006). These Ca^{2+} channels constitute the rate-limiting influx step on active Ca^{2+} absorption (Hoenderop et al., 2001) and are dynamically controlled by CaBP28K (Lambers et al., 2006). Consequently, the fact that CaBP28K protein expression is increased after 24 h lead us to think that *L. macrophylla* compounds may interact directly with surface membrane channels such as TRPV-6, which results in increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

In this study, although we cannot affirm that the increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ is due to a direct effect on PMCA1/4 gene regulation or an attempt to maintain the Ca^{2+} homeostasis in JEG-3 cells, it seems that the Ca^{2+} extrusion elements are involved in the establishment of Ca^{2+} homeostasis imbalance caused by *L. macrophylla* compounds. As CaBP are important for intracellular Ca^{2+} homeostasis, the PMCA have a crucial role in the maintenance of maternal to fetal Ca^{2+} gradient during pregnancy (Belkacemi et al., 2005a).

4.5. Conclusion

Alerts to the potential toxic effect of *L. macrophylla* during pregnancy should be considered. The interference on cell signalling pathways and Ca^{2+} transport of trophoblast cells may lead to aberrant or adaptative placental cell turnover that could cause early termination of pregnancy, gestational pathologies, or foetal growth defects.

Until now, to our knowledge, no information about *L. macrophylla* compounds and biological effects was reported. As a result, the present study reveals for the first time the isolation of triterpenoids from *L. macrophylla* and their influence on trophoblast-like cell signalling pathway and Ca^{2+} uptake.

4.6. Legends of figures

Figure 4.1. Structures of triterpenes isolated from the leaves of *L. macrophylla*. Lantanolic acid (a), Ursolic acid (b) and Oleanolic acid (c).

Figure 4.2. Cell viability of trophoblast-like cells treated with different doses of ethanolic extract from leaves of *L. macrophylla*. Cell viability was measured by WST-1 colorimetric assay. BeWo (A) cells were treated with either different concentrations of *L. macrophylla* (LAN 1 to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ethanolic plant extract or plant extracts + forskolin (FKL) (50 μM). JEG-3 (B) cells were treated with plant extracts only. Controls consisted of cells treated with DMSO only (CTL) (< 0.5%), FKL (50 μM) and hydroxide peroxide (H_2O_2) (30% solution). Results are expressed in percentage of controls. Statistical analysis were done using One way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison tests and paired t test (n=3).

Figure 4.3. Effect of *L. macrophylla* on trophoblast-like cells differentiation. Biochemical differentiation was verified by measuring the production of the differentiation marker, the human chorionic gonadotrophin (hCG) hormone, in the supernatant and values are expressed in percentage of control (A); Morphological differentiation was measured by counting multi-nucleated cells (syncytia) (B). A syncytium was defined as three or more nuclei (red) in the same cytoplasm without intervening surface desmosomal membrane (green) staining (B; iv and v). The syncytium counting was performed in 5 microscopic fields per well taken randomly and results are expressed as a number of syncytium counted (C). All observations were performed at 20X magnification on monolayer cells. Treatment consisted of *L. macrophylla* (LAN 1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) plant extract or plant extract + forskolin (FKL) (50 μM). Control consisted of cells treated with DMSO only (CTL) or cells treated with 50 μM FKL, PD98059 (PD) or SB203580 (SB). Data represent mean \pm SEM of three individual experiments. Statistical analysis were done using One way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test ***p<0.0001.

Figure 4.4. Effect of *L. macrophylla* on differentiation cell signaling pathways. The cAMP production (**A**) and phosphorylation state of ERK1/2 (**B and D**) and p38 MAPK pathways (**C and E**) were analyzed. Quantification of cAMP was performed by enzymatic immunoassay. The phosphorylation of ERK1/2 and p38 and total ERK1/2 and p38 were detected by Western blot analysis. Treatment consisted of *L. macrophylla* (LAN 1-100 µg/mL) plant extract or plant extract + FKL (50 µM). Controls consisted of cells treated with DMSO only (CTL) or 50 µM FKL, and specific MAPK inhibitors, PD98059 (PD) (50 µM) and SB203580 (SB) (10 µM). ERK1/2 (**B**) and p38 (**C**) phosphorylation state was measured after 48 h treatment. To verify rapid activation of ERK1/2 (**D**) and p38 (**E**) cells were starved for 24 h, subjected to different treatments for 1 h and reactivated with FBS for 10 min. Bar graph showing the densitometric analysis and the ratio between phospho-MAPK and total MAPK were performed using ImageJ 1.38x (National Institute of Health, USA). Data represent mean±SEM of 3-5 individual experiments. Statistical analysis was done using One way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison tests and paired t test; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.005 (vs CTL).

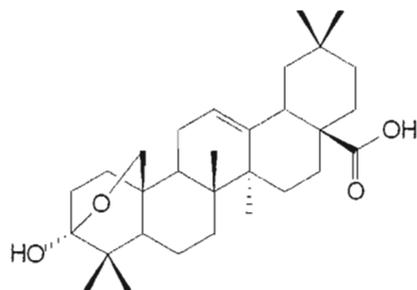
Figure 4.5. Effect of *L. macrophylla* on JEG-3 cell Ca²⁺ uptake. Cells were pretreated for 24 h with *L. macrophylla* (LAN1-100 µg/mL) and controls: 1α,25-Dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃) (0,5 nM and 100 nM), vehicle (ethanol or DMSO), or forskolin (FKL) (50 M) (A-E). The Ca²⁺ uptake was done at different time points (0 to 20 min) using ⁴⁵Ca²⁺. The Ca²⁺ uptake were expressed as nmol of Ca²⁺ per mg of cellular proteins. Data represent mean±SEM of three individual experiments. Paired t test (*p<0,05; **p<0,05; ***p<0,005) was used to analyze each time point.

Figure 4.6. Effect of *L. macrophylla* on JEG-3 cell surface membrane controlled Ca²⁺ uptake. Confluent JEG-3 cells were pretreated for 10 min with *L. macrophylla* (LAN1-100 µg/mL), CoCl₂.6H₂O (CoCl₂) (200 µM), or ruthenium red (RuR) (10 µM) (F) and analysed for Ca²⁺ influx at 0 (zero), 30 sec, and 1 min using ⁴⁵Ca²⁺. The Ca²⁺ uptake were expressed as nmol of Ca²⁺ per mg of cellular proteins. Data represent mean±SEM of three individual experiments. Paired t test (*p<0,05) was used to analyze each time point.

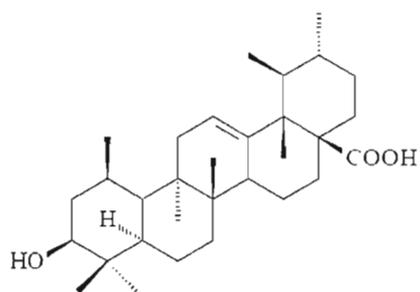
Figure 4.7. Effect of *L. macrophylla* treatment on Ca²⁺ transport proteins. After 24 h of treatment, the Ca²⁺ transport proteins PMCA1/4, TRPV-6, TCTP, and CaBP28 expression was measured in JEG-3 cells by Western blot. Results were expressed as a ratio of control cells which consisted of cells treated with DMSO only (CTL), forskolin (FKL) (50 µM) or 1α,25-Dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃) (100 nM). Data from five different experiments were compared and analyzed with paired t test (**p<0,005; ***p<0,0005).

Figure 4.8. Effect of *L. macrophylla* treatment on Ca²⁺ transport proteins mRNA expression. Total RNA was extracted from confluent JEG-3 cells after 24 h treatment with *L. macrophylla* (LAN1-100 µg/mL) and 1α,25-Dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃) (100 nM). mRNA expression of PMCA1, PMCA4, TRPV-6, and TCTP, was measured using semi quantitative Real-time PCR. Control (CTL) consisted of cells treated with vehicle (DMSO). Results are expressed by the normalized ratio of each sample using ribosomal gene 18S as reference. Data represent mean±SEM from three different treatments. Paired t test (*p<0,05).

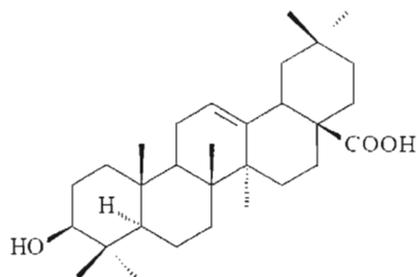
Figure 4.1.



a) Lantanolic acid



b) Ursolic acid



c) Oleanolic acid

Figure 4.2.

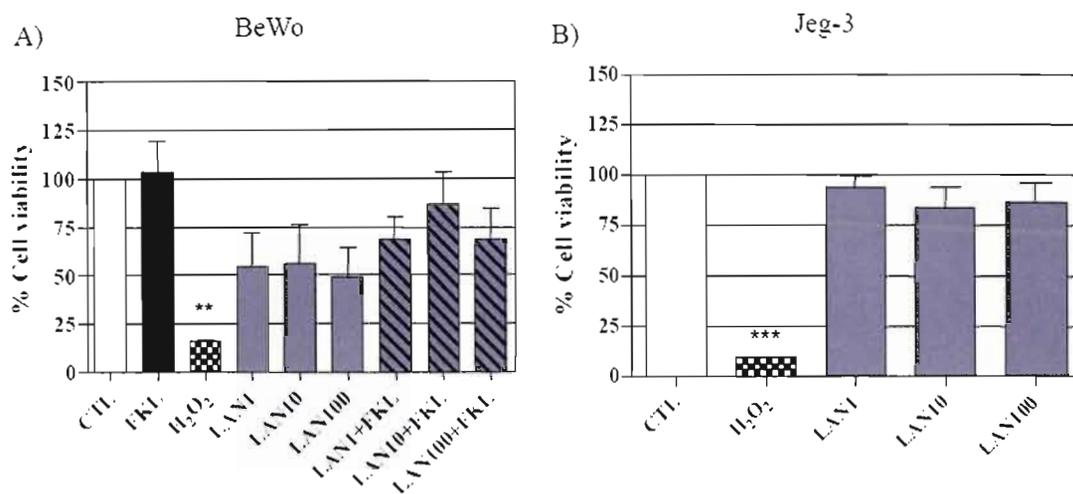


Figure 4.3.A.

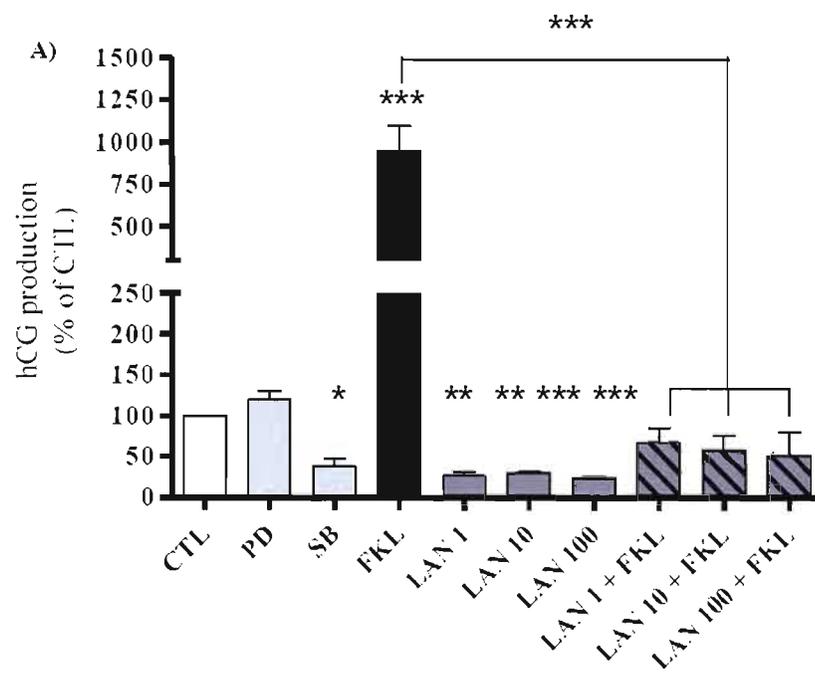


Figure 4.3.B.

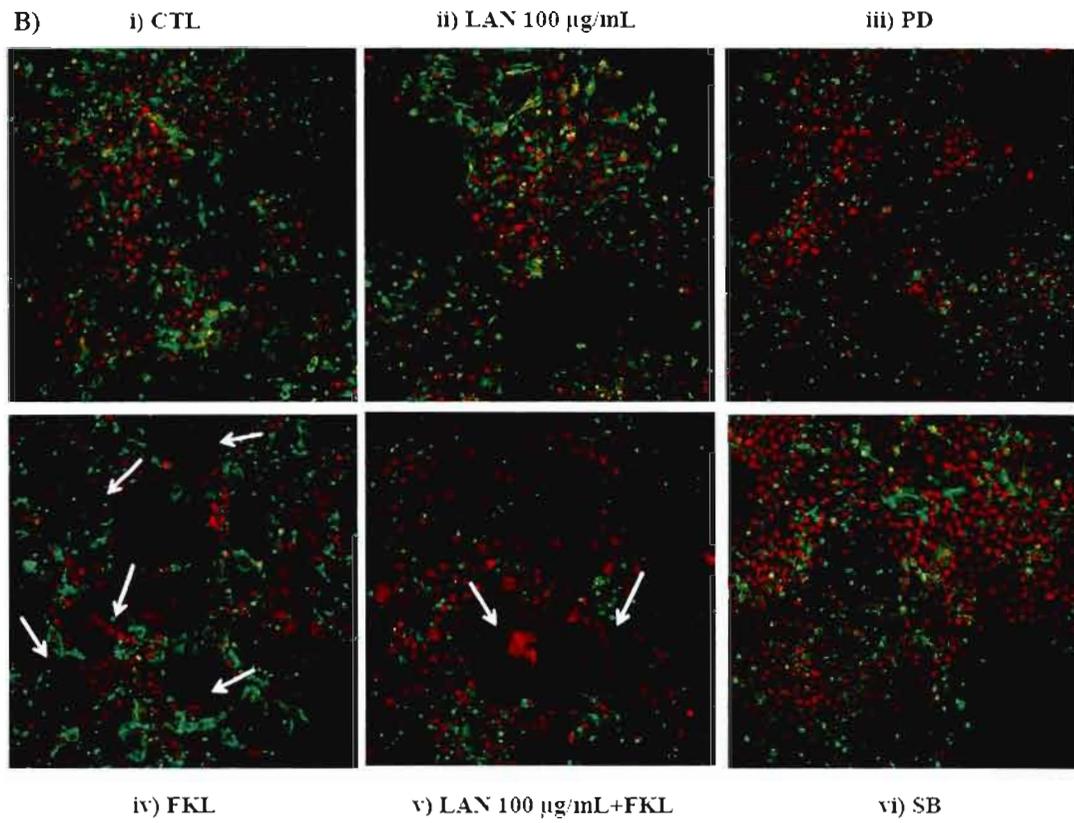


Figure 4.3.C.

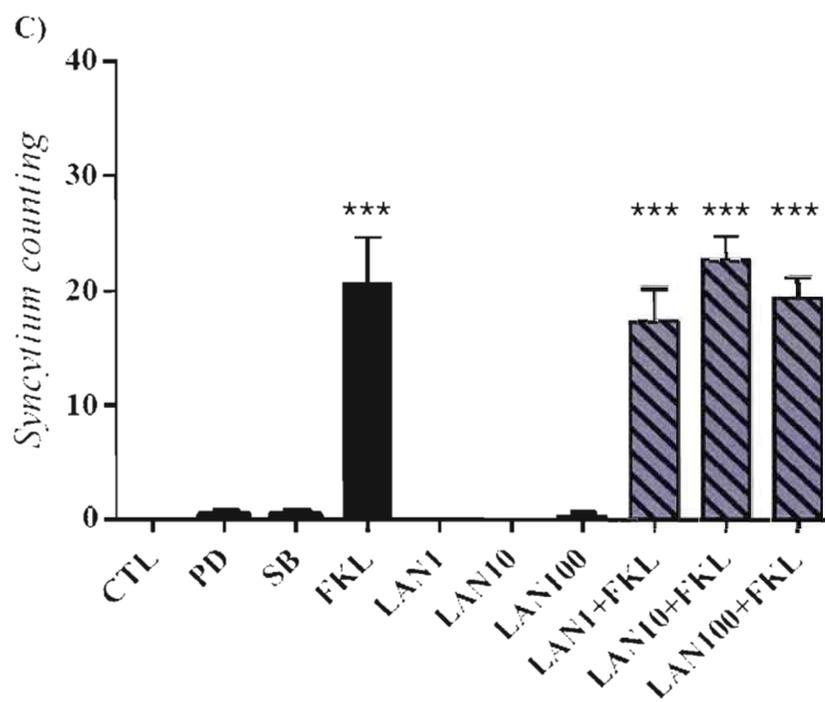


Figure 4.4.A.

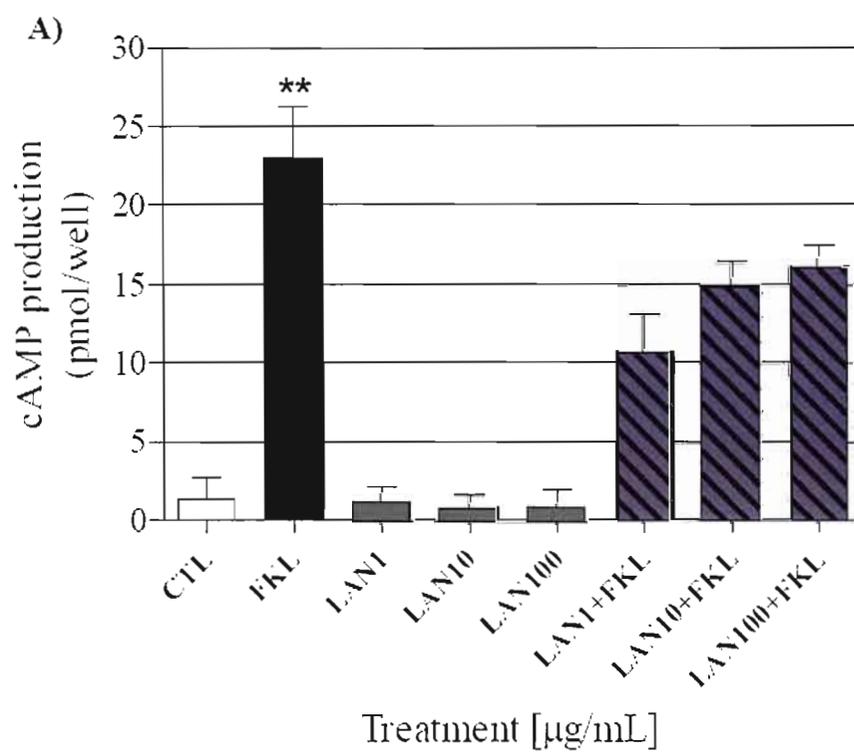


Figure 4.4.B. et Figure 4.4.C.

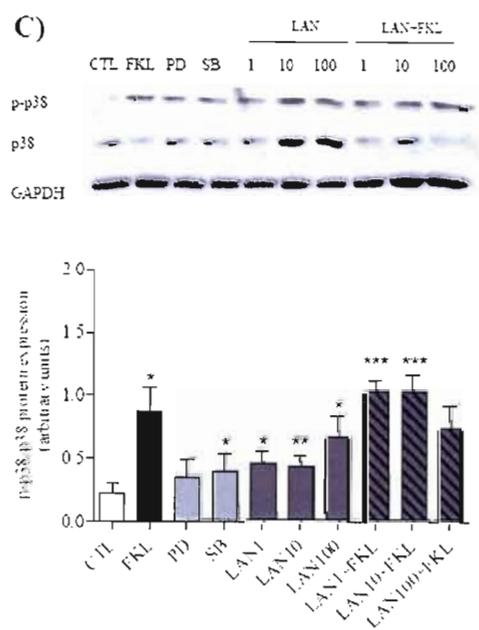
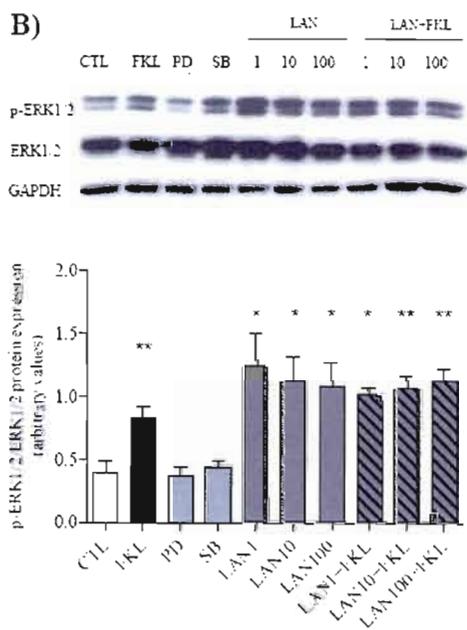


Figure 4.4.D et Figure 4.4.E.

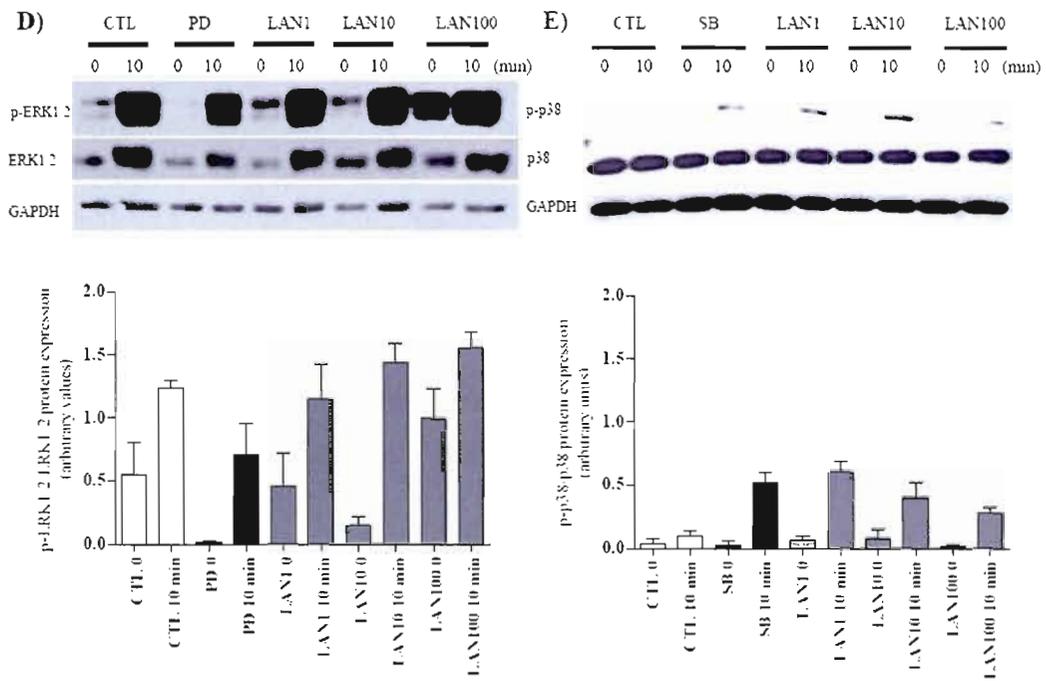


Figure 4.5.A et Figure 4.5.B.

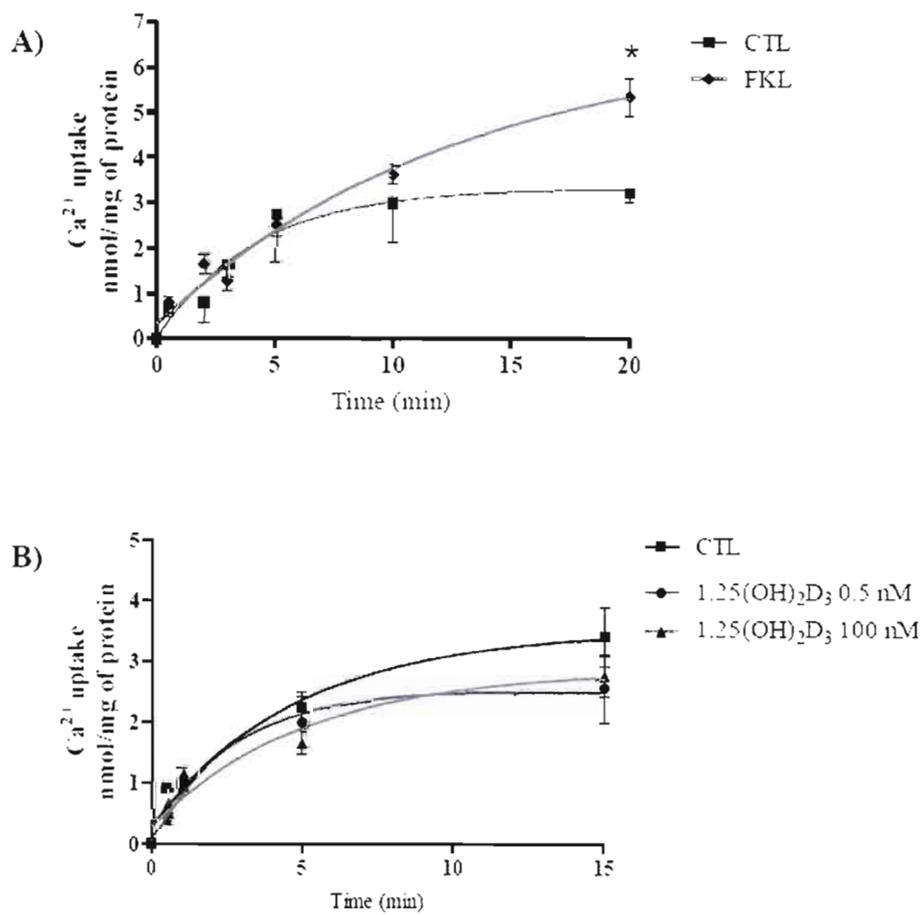


Figure 4.5.C, Figure 4.5.D. et Figure 4.5.E.

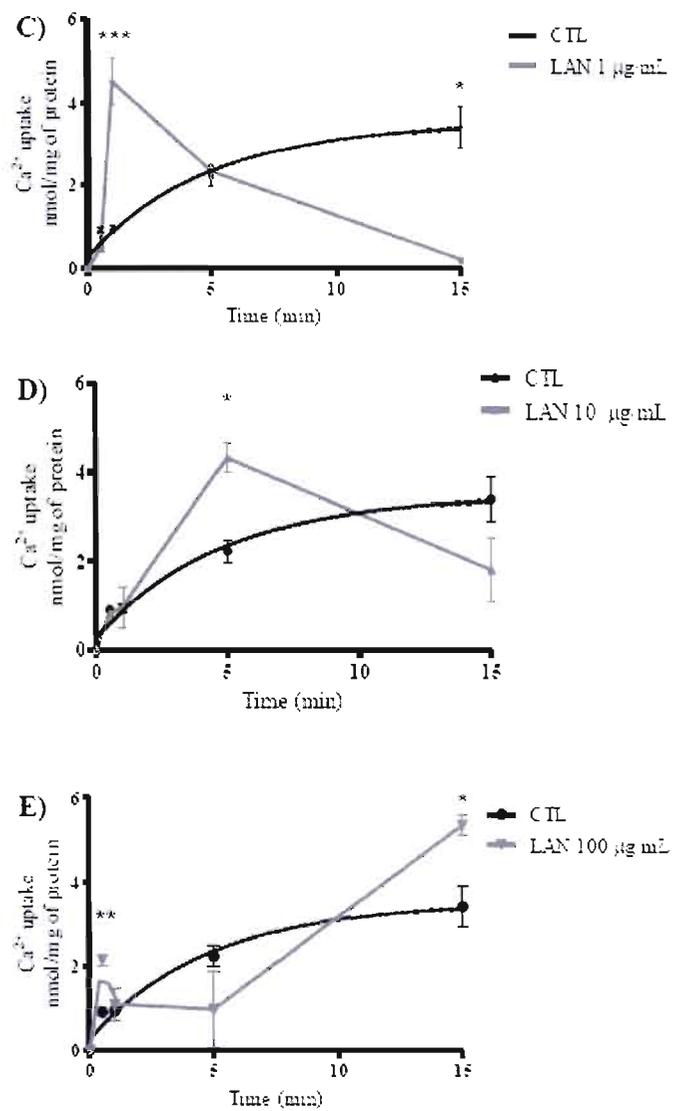


Figure 4.6.

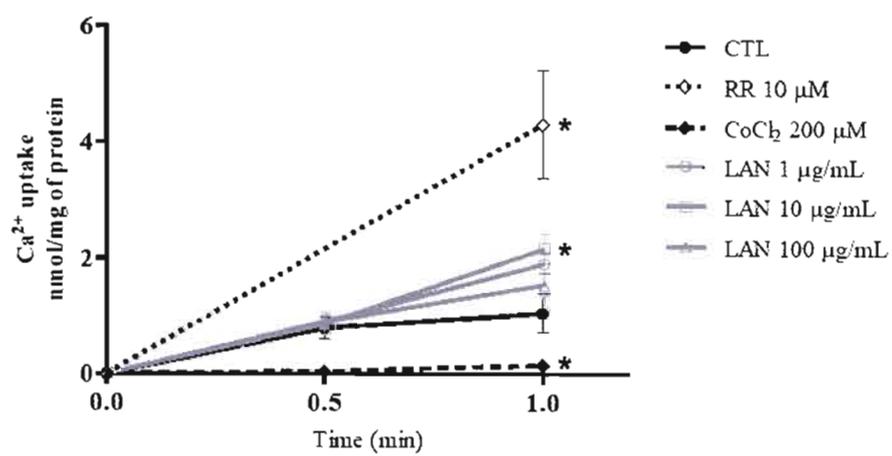


Figure 4.7.

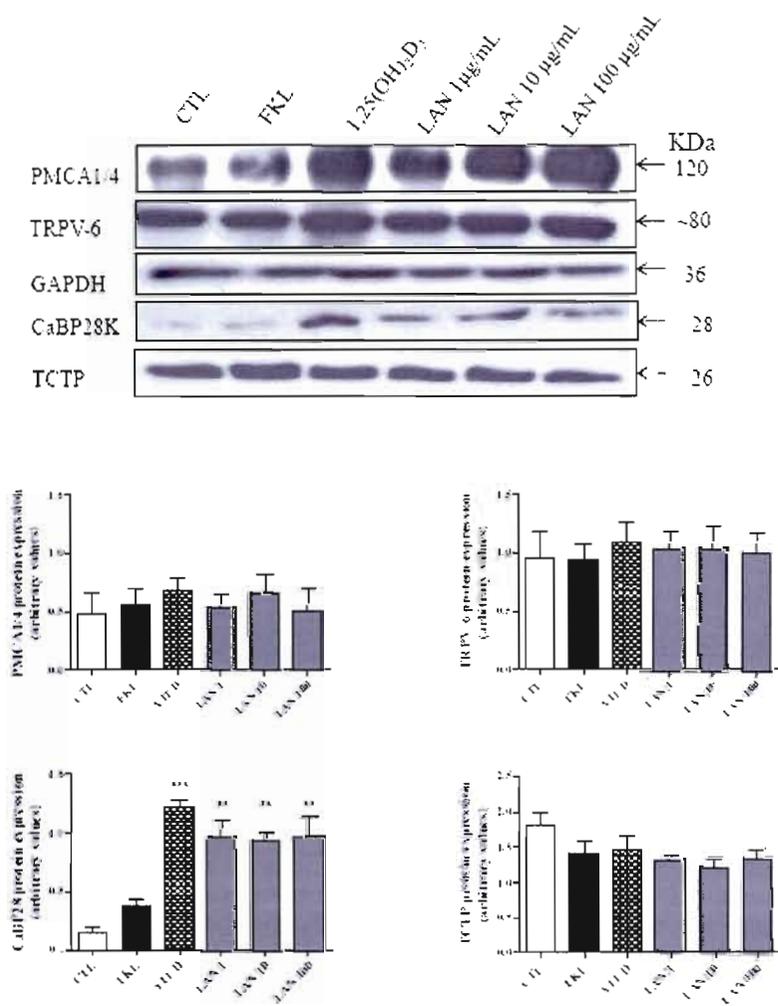
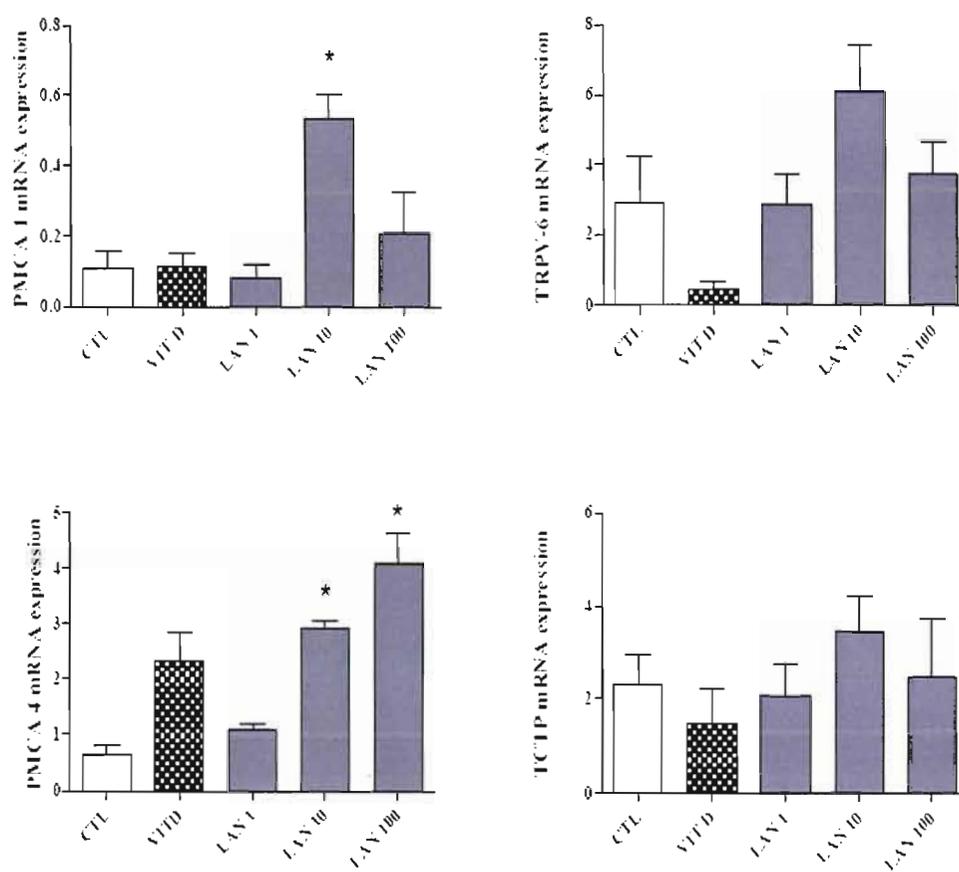


Figure 4.8.



CHAPITRE 5

DISCUSSION GÉNÉRALE

L'utilisation des plantes comme ressources médicinales est encore aujourd'hui la forme de thérapie naturelle la plus répandue à travers le monde. La connaissance des effets secondaires provenant de l'utilisation abusive et/ou incorrecte des drogues synthétiques, la croyance dans la médecine folklorique ainsi que la conscience écologique de nos contemporains ont pour conséquence une utilisation de plus en plus grande des plantes comme thérapie « sécuritaire » (Rates, 2001). Cette augmentation s'avère également en ce qui concerne la consommation des plantes médicinales durant la grossesse. Plusieurs études démontrent une forte adhésion à ce type de thérapie par les femmes enceintes ainsi que par les professionnels de la santé qui les assistent (Glover et al., 2003; Marcus et Snodgrass, 2005; Refuerzo et al., 2005; Oliveira et al., 2006; Holst et al., 2008; Veiga Juinor, 2008; Zhang et al., 2008; Moussally et al., 2009).

Bien que l'utilisation de ces ressources thérapeutiques soit raisonnable et légitime, elle devrait néanmoins exiger davantage que la connaissance populaire. La consommation des plantes médicinales doit correspondre réellement à la fonction thérapeutique indiquée dans la culture traditionnelle en plus de respecter les exigences de qualité et d'innocuité. Pour cette raison, plusieurs recherches sont réalisées dans le but de valider l'efficacité et d'assurer l'innocuité de ce type de thérapie. Toutefois, au regard de la diversité végétale mondiale, la quantité d'informations sur les effets des plantes médicinales est encore faible (Rates, 2001; Firenzuoli et Gori, 2007).

Ainsi, malgré les efforts d'assurer l'efficacité ou l'innocuité des produits naturels investis par les organisations publiques de santé et la communauté scientifique, l'utilisation

de plantes médicinales au cours de la grossesse est loin d'être exempte de toute incertitude. Par exemple, SJW, une des plantes les plus utilisées par les femmes enceintes (Glover et al., 2003; Zhang et al., 2008; Holst et al., 2008) et objet de notre étude, est largement étudiée *in vitro* et *in vivo* (Butterweck et al., 1997; Jacobson et al., 2001; Butterweck et al., 2002; Borges et al., 2005; Jean et al., 2006; Sanchez-Reus et al., 2007). De plus, les études cliniques sur la pharmacocinétique et la pharmacodynamique de certains composants de SJW sont assez avancées (Wurglics et Schubert-Zsilavecz, 2006), ce qui n'est pas le cas de la majorité des plantes médicinales. Cependant, à notre connaissance, aucune étude sur l'effet de cette plante et de ses composés sur la formation et la fonction du placenta humain n'a été rapportée dans la littérature.

Nos recherches ont démontré que, outre la SJW, deux autres plantes médicinales, *G.americana* et *L. macrophylla*, peuvent avoir un effet sur le placenta humain. En utilisant des modèles *in vitro*, on a pu donner une idée des interactions moléculaires entre ces plantes et les cellules humaines trophoblastiques ainsi que les évidences scientifiques de leurs effets chez l'humain. Nous sommes conscients que d'autres aspects, comme la métabolisation des substances par la mère, le placenta et le fœtus (Sastry, 1999), sont aussi importants pour l'évaluation de la toxicité des plantes médicinales mais ces aspects n'ont pas été visés par notre recherche.

Dans ce travail, on a utilisé les cellules de lignées fusigénique et non-fusigénique, BeWo et JEG-3 comme modèles *in vitro* pour le placenta. Ces cellules dérivées de choriocarcinome humain se sont avérées être de bons outils pour la présélection des espèces de plantes et des doses d'extrait qui ne représentent pas un potentiel toxique et qui sont aptes à passer à l'étape de tests précliniques plus avancés (tests *in vivo*). Certaines caractéristiques sont effectivement des points positifs, de nature à encourager l'utilisation de ces cellules: 1) la possibilité de réaliser plusieurs passages et de produire une grande quantité de cellules; 2) leur coût monétaire peu élevé en comparaison des trophoblastes primaires, de la transfusion placentaire ou du modèle *in vivo*; et 3) leur aptitude au transport de certaines substances (Tuan et al., 1991; Liu et al., 1997; Ushigome et al., 2000; Ampasavate et al., 2002; Wadsack et al., 2003; Kovo et Golan, 2008). Toutefois, les limitations par rapport à leur usage sont

aussi connues. Certaines propriétés peuvent être affectées en fonction de leur nature tumorale comme les expressions protéiques et génomiques des transporteurs cellulaires, ou par l'absence des facteurs environnementaux typiques du milieu placentaire *in vivo* (Sullivan, 2004). Par exemple, l'absence d'expression de VDR par les cellules JEG-3 (Pospechova et al., 2009) implique une réaction différentielle de ces cellules à la vitamine D et l'éventualité de masquer les effets des produits végétaux similaires. Même si nous n'avions pas, dans notre étude, pour objectif d'établir la différence entre ces deux types de cellules, on a pu apercevoir une différence de réponse dans le test de viabilité/prolifération entre les cellules BeWo et JEG-3 soumises au traitement avec *L. macrophylla* et *G. americana* (annexe 2.1), ce qui est probablement un effet associé à leur caractéristique intrinsèque unique déjà démontrée quant à la différenciation (Al-Nasiry et al., 2006; Vargas et al., 2008; Pospechova et al., 2009).

La différence des propriétés intrinsèques de ces deux types de cellules est un facteur important dont il faut tenir compte au moment de les choisir. La capacité des cellules BeWo de répondre à la stimulation par FKL à travers la différenciation morphologique (fusion) et biochimique (augmentation de la production de hCG) (Al-Nasiry et al., 2006) est une de leurs principales caractéristiques. Les cellules JEG-3, quant à elles, ne répondent que par la différenciation biochimique (Bahn et al. 1981; Taylor et al., 1997), ce qui fait des cellules BeWo la meilleure option pour les études de la différenciation cellulaire. Une seconde caractéristique est l'abondance de cellules disponibles. Pour les études toxicologiques de dose-réponse, où une quantité plus grande de cellules est nécessaire, la multiplication en vitesse et en quantité des cellules JEG-3 constituent un avantage certain de ces dernières.

Un autre aspect qui fait que ces cellules sont des bons modèles pour le placenta humain est la présence des mécanismes de régulation intracellulaire qui reflètent les mêmes mécanismes que ceux trouvés dans le tissu original (Sastry, 1999; Kovo et Golan, 2008). À notre connaissance, la présente étude est la première à rapporter l'implication des voies de MAPK ERK1/2 et p38 dans le processus de différenciation induite par la FKL. Le rôle de ces deux voies dans la formation du placenta avait été démontré dans les trophoblastes du placenta humain mis en culture (Daoud et al., 2005) ainsi que dans les trophoblastes en coupe histologique du lit placentaire (Moon et al., 2008). De cette façon, dans l'ensemble des

caractéristiques reliées à la différenciation cellulaire comme capacité de répondre aux stimuli en se fusionnant et produisant les hormones, les cellules BeWo semblent être un modèle assez fidèle pour le système placentaire.

Ainsi, un des points clé du processus de placentation humaine est la détermination du sort des CT en deux voies: CT extravilleux→invasion→cellules géantes/cellules endothéliales ou CT villeux→agrégation/fusion→formation des ST (Malassine, 2001; Evain-Brion, 2001; Cross, 2005). Par exemple, la dysfonction des trophoblastes au niveau subcellulaire et la perte fonctionnelle de la masse villeuse par mort cellulaire contribuent à l'interruption de la grossesse ou à une performance suboptimale du placenta menant au retard de croissance fœtale intra-utérin (Scifres et Nelson, 2009).

Dans ce processus de placentation, ce sont les interactions moléculaires dans l'interface materno-fœtale qui détermineront laquelle des options migration/prolifération ou fusion/différenciation des trophoblastes sera retenue. Ces interactions entraînent l'activation des voies de signalisation à travers la liaison entre les facteurs de croissance et leurs récepteurs. Le TGF- β produit par la décidua, par exemple, coordonne le signal qui restreint l'invasion et la migration du trophoblaste. Par contre, l'IGF-II produit dans les trophoblastes, envoie le signal qui stimule la migration de ces cellules. Ainsi, le dérèglement de ces interactions peut altérer l'homéostasie utéro-placentaire et entraîner des maladies gestationnelles telles que la pré-éclampsie et les tumeurs placentaires (Chakraborty et al., 2002; Constância et al., 2002; Li et al., 2005).

Dans ce contexte, l'effet des facteurs intrinsèques sur les interactions moléculaires et les événements qui les succèdent peuvent interférer dans la modulation du développement placentaire. Cela est également vrai des facteurs extrinsèques. Un exemple est l'herbimycine A, un antibiotique benzoquinonique, qui peut causer la diminution de la différenciation morphologique et biochimique des trophoblastes par l'inhibition des membres de la famille de SFK (Daoud et al., 2008). Un autre exemple est la FKL, un diterpène d'origine végétale, capable d'induire la différenciation des trophoblastes à travers l'activation de la voie de l'AMPc (Wice et al., 1990; Park et al., 1996; Egawa et al., 2008). Dans notre travail, nous

avons démontré que les stéroïdes de *G. americana* ont une influence significative sur l'activation des voies impliquées dans la différenciation des trophoblastes, les voies de MAPK ERK1/2 et p38, en association avec une diminution de la viabilité/prolifération cellulaire par les cellules BeWo. Aussi, dans notre étude, on a observé que les triterpènes de *L. macrophylla* ont également un effet, quoique moins robuste, sur la viabilité/prolifération des cellules BeWo. Ces résultats ont démontré que l'effet de ces trois triterpènes est accompagné d'une forte activation des voies de MAPK ainsi que d'une diminution significative de la production de la hCG. En somme, les études prouvent que les facteurs extrinsèques, comme certains produits d'origine végétale, peuvent interférer dans l'homéostasie placentaire et par conséquent dans la sécurité du fœtus.

De surcroît, les facteurs extrinsèques peuvent affecter la fonction placentaire, autant en interférant dans la formation du placenta qu'en agissant sur plusieurs mécanismes impliqués dans le transfert des substances à travers le placenta. L'homéostasie du Ca^{2+} placentaire est une de ces fonctions pouvant compromettre le développement du fœtus lorsqu'elle est altérée. Par exemple, l'effet toxique des métaux lourds sur le retard de la croissance fœtale est causé par l'interférence des métaux avec le transport du Ca^{2+} placentaire. En utilisant le modèle *in vitro* JEG-3, Lin et collègues (1997) ont démontré que le cadmium peut causer l'altération de l'habileté du trophoblaste à maintenir les niveaux optimaux de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. De même, Lafond et al., (2004) ont démontré que la concentration sanguine de plomb est associée à la modification du transfert de Ca^{2+} par les ST *in vitro*.

Parmi les facteurs extrinsèques, on trouve aussi des substances d'origine végétale pouvant avoir un effet sur le transport du Ca^{2+} placentaire. À défaut d'avoir établi quel mécanisme d'action était impliqué dans la tératogenèse fœtale chez les animaux, plusieurs chercheurs ont démontré que certaines plantes peuvent en être la cause (Araujo et al., 1996, Wilkinson, 2000, Gorniak et al., 2003; Mello et al., 2005). Les études antérieures à aujourd'hui ont démontré précisément l'action des substances actives de SJW, comme l'hyperforine, sur les canaux VDCC (Muller et al., 2001) et l'effet de l'hypericine sur la voie de régulation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$; (Gao et Ge, 2005).

Ainsi, nous avons suivi à travers notre étude l'effet des plantes médicinales sur la cinétique du transport du Ca^{2+} , sur l'influx du Ca^{2+} modulé par les canaux calciques membranaires et sur l'expression protéique des transporteurs de Ca^{2+} par les cellules trophoblastiques. Nos résultats ont démontré que les substances d'origine végétale présentes dans *L. macrophylla* et SJW, mais pas dans *G. americana* (annexe 2.2) peuvent augmenter la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ et moduler l'expression des protéines du transport de Ca^{2+} de façon différenciée (figure 5.1). Au rang de ces substances et extraits, il y a le SJW et l'hypericine qui causent l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ à long terme et qui régulent l'expression protéiques des TCTP, CaBP28, TRPV-6 et PMCA1/4. Ensuite, l'extrait brut de *L. macrophylla* augmente la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ à court (traitement de 10 minutes) et à long terme (traitement de 24 heures) indépendamment de la modulation de l'expression des protéines du transport du Ca^{2+} . La présence des triterpènes dans cette dernière plante indique que cet effet peut être associé à l'activation des mécanismes et des voies de signalisation qui contrôlent l'homéostasie de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, activation considérablement décrite dans la littérature (Tang et al. 2005; Gao et al. 2006; Lee et al., 2007; Shi et Li, 2007).

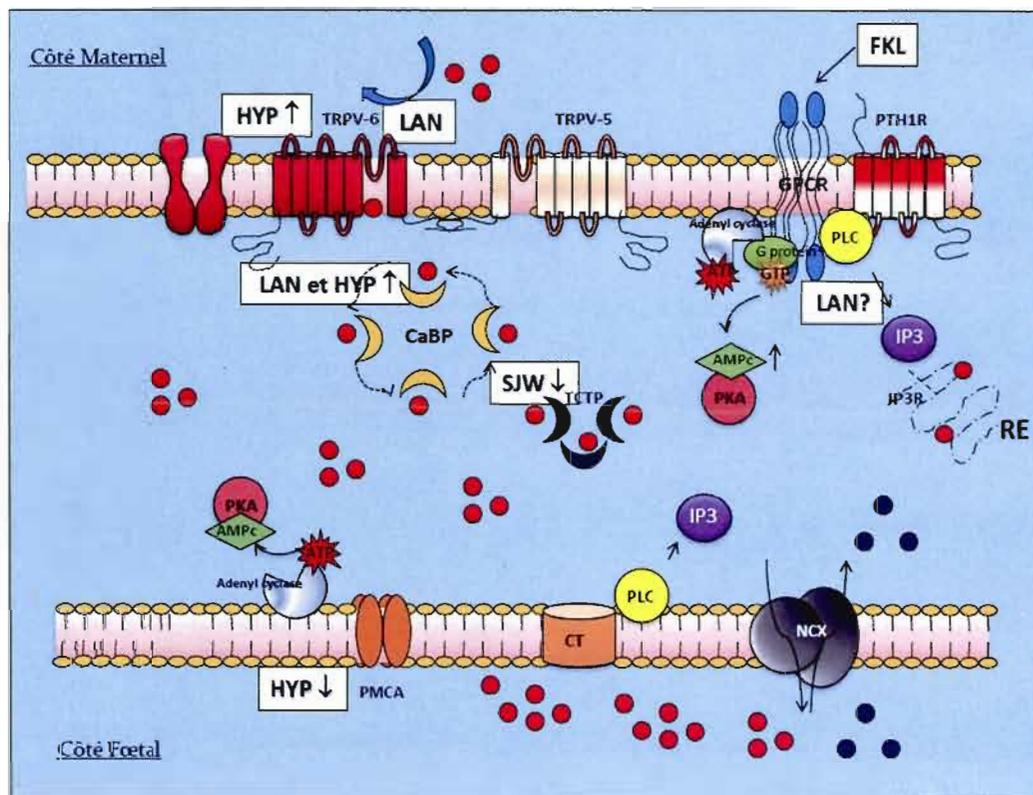


Figure 5.1 Schéma général de l'effet de Millepertuis (SJW), hypericine (HYP) et *Lantana macrophyla* (LAN) sur le transport du Ca^{2+} par les cellules JEG-3. ↑: augmentation de l'expression; ↓: diminution de l'expression; sphères rouges: Ca^{2+} ; sphères bleues: Na^{2+} ; AMPc, adenosine monophosphate cyclique; ATP, adenosine triphosphate; CaBP, calcium-binding proteins; CT, récepteur de calcitonine; GTP: guanosine triphosphate; IP3, inositol-1,4,5-triphosphate; N: noyaux; NCX: sodium-calcium exchanger; PKA, protein kinase A; PLC, phospholipase C; PTH1R, parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor; PTHrP mid-molecule, putative receptor that binds the mid-molecule fragment of PTHrP; RE: réticulum endoplasmique; TRPV, transient receptor potential, vanilloid family.

En plus de démontrer les mécanismes par lesquels ces trois plantes médicinales affectent la fonction des syncytiotrophoblastes, les résultats présentés ici conduisent à nous interroger sur certains aspects reliés à la recherche sur les plantes médicinales, tels que la collecte des plantes dans la nature, les usages traditionnels qu'on en fait, le dosage établi par la médecine traditionnelle ainsi que le devenir des extraits de plantes dans l'organisme.

Pour ce qui est de la pharmacocinétique, pharmacodynamique et la toxicinétique, les études des extraits bruts chez l'humain sont rares ou inexistantes et les conclusions à propos de la biodisponibilité de la majorité de ces substances pures sont spéculatives. Les informations indiquant la concentration plasmiqes des substances tel que l'hypericine et l'hyperforine (Wurglics et Schubert-Zsilavec, 2006), l'acide oléanolique (Song et al., 2006) et l'acide ursolinique (Liao et al., 2005) sont disponibles; cependant, on ne sait pas si une biotransformation pourrait generer des substances plus ou moin toxiques. Chez le rat l'acide oléanolique est métabolisé rapidement par le système microsomal et une petite quantité de la substance non métabolisé est excrété par l'urine après injection intraveineuse de cette substance (Ji et al., 2009). Chez l'humain, une basse concentration plasmiq, voire indétectable, de l'acide ursolinique et de l'acide oléanolique, est un indice de la présence de ces substances dans d'autre tissu que le compartiment sanguin et/ou de la métabolisation au niveau de l'intestin ou du foie (Liao et al., 2005; Song et al., 2006; Jeong et al., 2007; Ji et al., 2009). Même si nos observations sur les cellules trophoblastes-like (*in vitro*) ne nous permettent pas d'établir avec certitude ce qu'il adviendrait de ces cellules dans des conditions réelles (*in vivo*), les informations obtenues aident à comprendre l'interaction entre les produits d'origine végétale et le métabolisme cellulaire des mammifères.

Notre recherche démontre que l'extrait brut de SJW et l'hypericine purifiée n'agissent pas de la même façon sur le système de transport calcique, même s'ils ont présenté un effet toxique sur la $[Ca^{2+}]_i$. Cet effet différencié a aussi été démontré par Butterweck et al. (2003) en relation à l'effet antidépresseur de l'extrait brut de SJW et les différentes fractions de cet extrait. Ces résultats nous indiquent que l'ensemble des substances dans les extraits bruts génère une action antagoniste ou synergique de ces substances et c'est précisément cette

action qui est la clé de voûte de l'effet thérapeutique (incluant la connaissance et les mises en garde à l'égard des effets toxiques) prévu par l'usage traditionnel.

Notre étude illustre aussi l'importance des aspects reliés à la collecte des plantes *in natura* pour l'interprétation des résultats scientifiques. L'analyse phytochimique de *Genipa americana* a démontré la présence d'une classe de substances végétales qui n'étaient pas décrite auparavant et l'absence des produits déjà rapportés dans la littérature pour ce fruit. Selon notre discussion au chapitre 3, ce fait peut indiquer une composition chimique différente au cours de la phase de maturation de la plante et entre les fruits récoltés à différentes localisations géographiques. En ce qui concerne le choix du moment de la récolte, il est important de suivre les indications de la culture populaire en se fiant aux témoignages de la communauté usagère de *G. americana*. Par ailleurs, les résultats de l'analyse chimique et physique des fruits (Souza, 2007) nous renseignent sur l'importance de la génétique de l'arbre. Ainsi donc, la génétique de l'arbre et le moment de la cueillette de ses fruits sont des critères à prendre hautement en considération pour la préparation des dérivés comestibles et médicinaux de cette plante.

Enfin, un quatrième aspect mis en évidence par nos études est le seuil entre la dose thérapeutique et la dose toxique des plantes. Les résultats obtenus avec la *Lantana macrophylla* en particulier ont démontré une différence marquée d'effet sur le transport du Ca^{2+} entre les concentrations utilisées en dessous des doses considérées comme physiologiques ($< 100 \mu\text{g/mL}$). Ces résultats indiquent qu'il doit y avoir un point de solubilité optimale des métabolites végétaux dans laquelle l'action physiologique ou toxique des substances est achevée. Soit dit en passant, dans l'usage traditionnel, ce point optimal est établi par la « sagesse populaire ».

En résumé, en utilisant ces deux modèles cellulaires, nous avons pu établir l'effet toxique distinctif des plantes médicinales sur la formation et la fonction du placenta. Les résultats ont démontré l'effet néfaste de SJW et d'hypericine sur le transport du Ca^{2+} , l'effet inhibiteur de la *G. americana* sur la viabilité/prolifération cellulaire et l'effet nocif de *L. macrophylla* sur ces deux processus cellulaires combinés. Ainsi, ces résultats pointent-ils vers

l'importance de la surveillance pharmacologique au moment de la prescription et la prise de médicament à base de plantes médicinales, et d'une prudence lors de la grossesse.

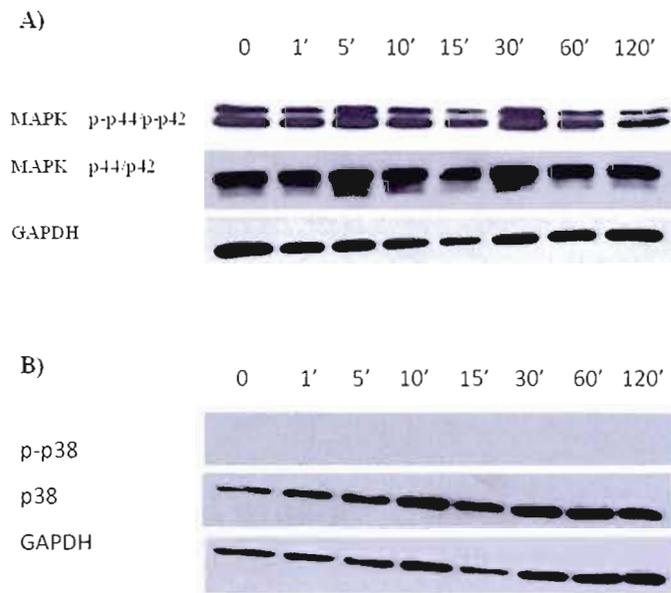
Nous avons confirmé certaines de nos hypothèses, soit que les composants des plantes médicinales peuvent interférer dans les processus cellulaires, comme les voies de signalisation et l'expression protéique, soit qu'ils agissent à travers des molécules de surface cellulaire. Ces interactions peuvent entraîner des conséquences graves sur le développement du fœtus et démontrent l'importance comme nous le mentionnions de la pharmacovigilance des plantes médicinales par les professionnels de la santé.

Les travaux présentés dans cette thèse représentent notre humble contribution à l'ethnopharmacologie des plantes médicinales. Comme c'est presque toujours le cas dans ce genre d'études, le nombre des questions auxquelles celles-ci répondent sont assurément moins grandes que celui des questions laissées sans réponse. Pour faire suite à cette étude, il serait intéressant de s'attaquer à certaines cibles bien précises des domaines de la phytochimie et de la biologie moléculaire et cellulaire; par exemple déterminer l'effet de l'hyperforine et/ou l'action de différentes fractions de SJW; identifier plus précisément les stéroïdes du fruit de *G. americana* ainsi que les métabolites présents dans d'autres parties végétales de cette plante; isoler les métabolites de *L. macrophylla* par le fractionnement de l'extrait éthanolique; déterminer l'action d'extrait de ces plantes sur d'autres voies de signalisation de la différenciation cellulaire; déterminer l'action des extraits bruts ou des substances isolées par la liaison aux récepteurs membranaires ou aux transporteurs membranaires de Ca^{2+} ; déterminer l'activité des microsomes placentaires sur la métabolisation d'extraits bruts ou des substances isolées. Pour conclure, il serait intéressant de mener d'autres études précliniques qui vérifieraient l'effet de ces plantes médicinales sur la formation et la fonction placentaire en utilisant le modèle murin *in vivo*.

ANNEXE I

État d'activation de la voie des MAPK, ERK1/2 et p38, des cellules BeWo après 24 heures de repos cellulaire (*starvation*) et stimulation par SFB

A1.1

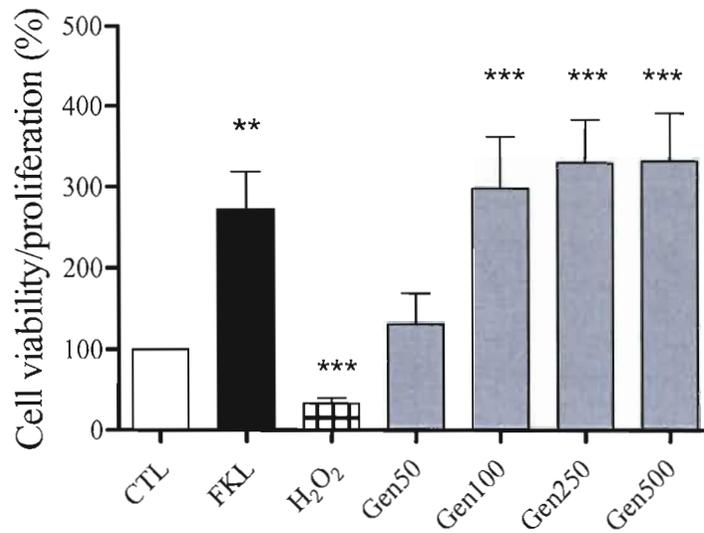


ERK 1/2 (A) and p38 (B) time course activation were determined by Western blot and immunodetection for phosphorylated and independent of phosphorylation state (total) forms. Cells were submitted to 24 h starvation and stimulation with FBS at different time point (1', 5', 10', 15', 30', 60', and 120'). Western blot analyses were done with cell lysates containing equal amounts of protein (5-10 μ g). Time '0' represents cells not stimulated with FBS.

ANNEXE II

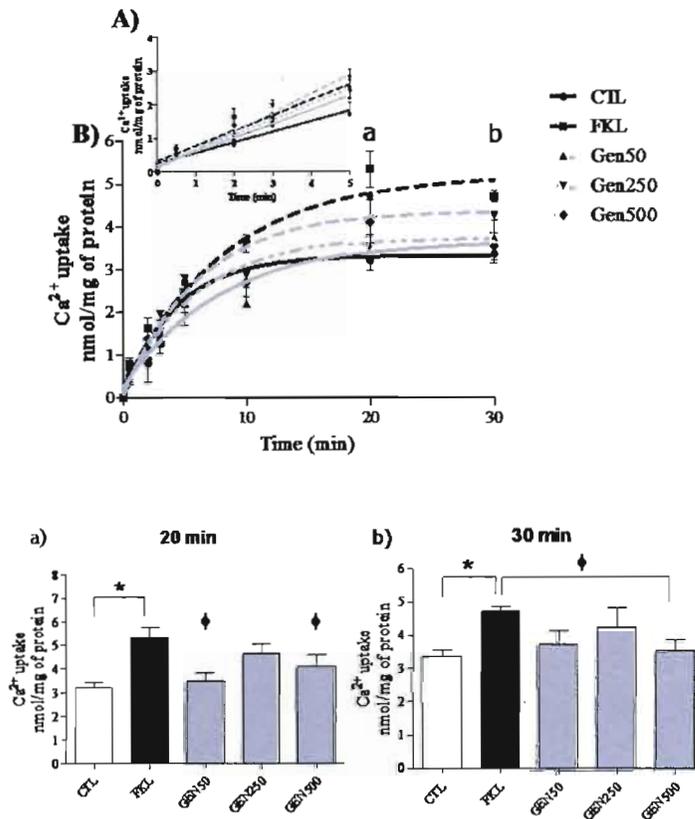
Résultats de l'action de *Genipa americana* sur la viabilité/prolifération et
l'influx du Ca^{2+} des cellules JEG-3

A2.1



Cell viability/proliferation effect of *G. americana* in human choriocarcinoma cell line (JEG-3) measured by WST-1 colorimetric assay. JEG-3 cells were treated with different concentrations of *G. americana* (Gen) plant extract (50 to 500 $\mu\text{g/mL}$) and verified by WST-1 technique. Controls consisted of cells treated with DMSO only (CTL) (< 0.5%), hydrogen peroxyde (H_2O_2) and forskolin (FKL) (50 μM). Data are representative of 3 experiments made in duplicate. Results are expressed in percentage of DMSO control cells. Statistical analysis were done using One way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison tests and Student's *t* test; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$.

A2.2



Effect of *G. americana* on JEG-3 cell Ca^{2+} uptake. Cells were pretreated for 24 h with *G. americana* (Gen50, 250 and 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and controls: vehicle (DMSO) or forskolin (FKL) (50 μM). The Ca^{2+} uptake was done at different time points (0 to 30 min) using $^{45}\text{Ca}^{2+}$. The Ca^{2+} uptake were expressed as nmol of Ca^{2+} per mg of cellular proteins. Significant difference (**a** and **b**) between FKL and CTL and Gen and FKL were observed at 20 and 30 min. Data represent mean \pm SEM of three individual experiments. Paired t test ($\diamond p < 0,05$ pour FKL vs Gen; * $p < 0,05$; ** $p < 0,05$; *** $p < 0,005$) was used to analyze each time point.

REFÉRENCES

- _____. 2002. Who Traditional Medicine Strategy 2002-2005., WHO/EDM/TRM/2002.1., Geneva, World Health Organization.
- _____. 2008. Médicaments et produits de santé: extrait de thé vert. Santé Canada. http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/prodnatur/applications/licen-prod/monograph/mono_greentea-thevert-fra.php , 20 mar. 2010.
- _____. 2009. Cambará-De-Folha-Grande. <http://www.liberherbarum.com/Minor/BZ/Pn8149.htm> , 5 dec. 2009.
- Aartsen, W.M., Arsanto, J.P., Chauvin, J.P., Vos, R.M., Versteeg, I., Cardozo, B.N., Bivic, A.L., Wijnholds, J. 2009. «Psd95beta regulates plasma membrane Ca²⁺ pump localization at the photoreceptor synapse.» *Mol Cell Neurosci*, vol. 41, p. 156-165.
- Agell, N., Bachs, O., Rocamora, N., Villalonga, P. 2002. «Modulation of the Ras/Raf/Mek/Erk Pathway by Ca(2+), and Calmodulin.» *Cell Signal*, vol. 14, p. 649-654.
- Ahmed, Z.F., Shoaib, A.M., Wassel, G.M., el-Sayyad, S.M. 1972. «Phytochemical study of Lantana camara L.» *Planta Med*, vol. 21, p. 282-288.
- Akella, R., Moon, T.M. et Goldsmith, E.J. 2008. «Unique Map Kinase Binding Sites.» *Biochim Biophys Acta*, vol. 1784, no. 1, p. 48-55.
- Albrecht, E.D. et Pepe, G.J., 1990. «Placental steroid hormone biosynthesis in primate pregnancy.» *Endocr Rev* vol.11, no 1, 124-150.
- Alessi, D.R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D.T., Saltiel, A.R. 1995. «Pd 098059 is a specific inhibitor of the activation of Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase in vitro and in vivo.» *J Biol Chem*, vol. 270, no 46, p. 27489-27494.
- Al-Nasiry, S., Spitz, B., Hanssens, M., Luyten, C., Pijnenborg, R. 2006. «Differential effects of inducers of syncytialization and apoptosis on Bewo and Jeg-3 choriocarcinoma cells.» *Hum Reprod*, vol. 21, no 1, p. 193-201.
- Alsat, E., Malassiné, A., Tarrade A., Merviel P., Évain-Brion, D, 1999. «Le cytotrophoblaste humain, un casse-tête pour le biologiste.» *Médecine/Sciences* vol. 15, no 11, 1236-1243.

- Al-Sereiti, M.R., Abu-Amer, K.M., Sen, P. 1999. «Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials.» *Indian J Exp Biol.*, vol. 37, no 2, p. 124-30.
- Aminin, D.L., Agafonova, I.G., Gnedoi, S.N., Strigina, L.I., Anisimov, M.M. 1999. «The effect of pH on biological activity of plant cytotoxin caulocide C.» *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, vol. 122, no 1, p. 45-51.
- Ampasavate, C., Chandorkar, G.A., Vande Velde, D.G., Stobaugh, J.F., Audus, K.L. 2002. «Transport and metabolism of opioid peptides across Bewo cells, an in vitro model of the placental barrier.» *Int J Pharm*, vol. 233, no 1-2, p. 85-98.
- Aplin, J.D. 1991. «Implantation, trophoblast differentiation and haemochorial placentation: mechanistic evidence in vivo and in vitro.» *J Cell Sci*, vol. 99 (Pt 4), p. 681-692.
- Araujo, I.B., Souza, C.A., De-Carvalho, R.R., Kuriyama, S.N., Rodrigues, R.P., Vollmer, R.S., Alves, E.N., Paumgarten, F.J. 1996. «Study of the embryofetotoxicity of alpha-terpinene in the rat.» *Food Chem Toxicol*, vol. 34, no 5, p. 477-482.
- Arcuri, F., Papa, S., Meini, A., Carducci, A., Romagnoli, R., Bianchi, L., Riparbelli, M.G., Sanchez, J.C., Palmi, M., Tosi, P., Cintonino, M. 2005. «The translationally controlled tumor protein is a novel calcium binding protein of the human placenta and regulates calcium handling in trophoblast cells.» *Biol Reprod*, vol. 73, no 4, p. 745-751.
- Asano, G., Takashi, E., Ishiwata, T., Onda, M., Yokoyama, M., Naito, Z., Ashraf, M., Sugisaki, Y. 2003. «Pathogenesis and protection of ischemia and reperfusion injury in myocardium.» *J Nippon Med Sch*, vol. 70, no 5, p. 384-392.
- Audus, K.L., Soares, M.J. et Hunt, J.S. 2002. «Characteristics of the fetal/maternal interface with potential usefulness in the development of future immunological and pharmacological strategies.» *J Pharmacol Exp Ther*, vol 301, no 2, p. 402-409.
- Babalola, G.O., Coutifaris, C., Soto, E.A., Kliman, H.J., Shuman, H., Strauss, J.F., 3rd. 1990. «Aggregation of dispersed human cytotrophoblastic cells: lessons relevant to the morphogenesis of the placenta.» *Dev Biol*, vol. 137, no 1, p. 100-108.
- Baggaley, E., McLarnon, S., Demeter, I., Varga, G., Bruce, J.I. 2007. «Differential regulation of the apical plasma membrane Ca(2+) –ATPase by protein kinase a in parotid acinar cells.» *J Biol Chem*, vol. 282, no 52, p. 37678-37693.
- Bahn, R.S., Worsham, A., Speeg, K.V., Jr., Ascoli, M., Rabin, D. 1981. «Characterization of steroid production in cultured human choriocarcinoma cells.» *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 52, no 3, p. 447-450.

- Bain, M.D., Copas, D.K., Taylor, A., Landon, M.J., Stacey, T.E. 1990. «Permeability of the human placenta in vivo to four non-metabolized hydrophilic molecules.» *J Physiol*, vol. 431, p. 505-513.
- Barber, R., Goka, T.J., Butcher, R.W. 1987. «Role of high affinity camp phosphodiesterase activities in the response of S49 cells to agonists.» *Mol Pharmacol*, vol. 32, no 6, p. 753-759.
- Barroso, G.M., A.L. Peixoto, C.L.F. Ichaso, C.G. Costa, E.F. Guimarães, Lima., H.C. 1986. «Sistemática de angiospermas do Brasil.» Viçosa: Universidade Federal de Viçosa.
- Battaglia, F.C. et Meschia, G., 1988. «Fetal nutrition.» *Annu Rev Nutr*, vol. 8, p. 43-61.
- Bechi, N., Ietta, F., Romagnoli, R., Focardi, S., Corsi, I., Buffi, C., Paulesu, L. 2006. «Estrogen-like response to P-nonylphenol in human first trimester placenta and Bewo choriocarcinoma cells.» *Toxicol Sci*, vol. 93, no 1, p. 75-81.
- Beebe, L.A., Cowan, L.D. et Altshuler, G. 1996. «The epidemiology of placental features: associations with gestational age and neonatal outcome.» *Obstet Gynecol*, vol. 87, 5 Pt 1, p. 771-778.
- Belkacemi, L., Bedard, I., Simoneau, L., Lafond, J. 2005a. «Calcium channels, transporters and exchangers in placenta: a review.» *Cell Calcium*, vol. 37, no1, p. 1-8.
- Belkacemi, L., Gariépy, G., Mounier, C., Simoneau, L., Lafond, J. 2003. «Expression of calbindin-D28k (Cabp28k) in trophoblasts from human term placenta.» *Biol Reprod*, vol. 68, no 6, p. 1943-1950.
- Belkacemi, L., Gariépy, G., Mounier, C., Simoneau, L., Lafond, J. 2004. «Calbindin-D9k (Cabp9k) localization and levels of expression in trophoblast cells from human term placenta.» *Cell Tissue Res*, vol. 315, no 1, p. 107-117.
- Belkacemi, L., Simoneau, L. et Lafond, J. 2002. «Calcium-binding proteins: distribution and implication in mammalian placenta.» *Endocrine*, vol. 19, no 1, p. 57-64.
- Belkacemi, L., Zuegel, U., Steinmeyer, A., Dion, J.P., Lafond, J. 2005b. «Calbindin-D28k (Cabp28k) identification and regulation by 1,25-Dihydroxyvitamin D3 in human choriocarcinoma cell line Jeg-3.» *Mol Cell Endocrinol*, vol. 236, no 1-2, p. 31-41.

- Beltman, J., Erickson, J.R., Martin, G.A., Lyons, J.F., Cook, S.J. 1999. «C3 yoxin activates the stress signaling pathways, Jnk and P38, but antagonizes the activation of Ap-1 in Rat-1 cells.» *J Biol Chem*, vol. 274, no 6, p. 3772-3780.
- Benirschke, K. et Kauffman, P. 1995. «Early development of the human placenta. In: *Pathology of the Human Placenta*, Benirschke K et K. P (Eds.), p. 49-56. New York: Springer-Verlag.
- Bent, S., Goldberg, H., Padula, A., Avins, A.L. 2005. «Spontaneous bleeding associated with ginkgo biloba: a case report and systematic review of the literature.» *Journal of General Internal Medicine*, vol. 20, no 7, p. 657-661.
- Berggard, T., Miron, S., Onnerfjord, P., Thulin, E., Akerfeldt, K.S., Enghild, J.J., Akke, M., Linse, S. 2002. «Calbindin D28k exhibits properties characteristic of a Ca^{2+} sensor.» *J Biol Chem*, vol. 277, no 19, p. 16662-16672.
- Bernatchez, R., Belkacemi, L., Rassart, E., Daoud, G., Simoneau, L., Lafond, J. 2003. «Differential expression of membrane and soluble adenylyl cyclase isoforms in cytotrophoblast cells and syncytiotrophoblasts of human placenta.» *Placenta*, vol. 24, no 6, p. 648-657.
- Bernucci, L., Henriquez, M., Diaz, P., Riquelme, G. 2006. «Diverse calcium channel types are present in the human placental syncytiotrophoblast basal membrane.» *Placenta*, vol. 27, no 11-12, p. 1082-1095.
- Berra, E., Diaz-Meco, M.T. et Moscat, J. 1998. «The activation of P38 and apoptosis by the inhibition of Erk is antagonized by the phosphoinositide 3-Kinase/Akt pathway.» *J Biol Chem*, vol. 273, no 17, p. 10792-10797.
- Berridge, M.J. 1987. «Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers.» *Annu Rev Biochem*, vol. 56, p. 159-193.
- Berridge, M.J. 1995. «Inositol trisphosphate and calcium signaling.» *Ann N Y Acad Sci*, vol. 766, p. 31-43.
- Blanco-Aparicio, C., Torres, J., Pulido, R. 1999. «A novel regulatory mechanism of MAP kinases activation and nuclear translocation mediated by Pka and the Ptp-Sl tyrosine phosphatase.» *J Cell Biol*, vol. 147, no 6, p. 1129-1136.
- Blaustein, M.P. et Lederer, W.J. 1999. «Sodium/Calcium exchange: its physiological implications.» *Physiol Rev*, vol. 79, no 3, p. 763-854.

- Blaustein, M.P., Juhaszova, M., Golovina, V.A., Church, P.J., Stanley, E.F. 2002. «Na/Ca exchanger and PMCA localization in neurons and astrocytes: functional implications.» *Ann N Y Acad Sci*, vol. 976, p. 356-366.
- Bohm, H., Benndorf, R., Gaestel, M., Gross, B., Nummer, P., Kraft, R., Otto, A., Bielka, H. 1989. «The growth-related P23 of the Ehrlich ascites tumor: translational control, cloning and primary structure.» *Biochem Int*, vol. 19, p. 277-286.
- Bommer, U.A., Borovjagin, A.V., Greagg, M.A., Jeffrey, I.W., Russell, P., Laing, K.G., Lee, M., Clemens, M.J. 2002. «The mRNA of the translationally controlled tumor protein P23/TCTP is a highly structured RNA, which activates the dsRNA-dependent protein kinase Pkr.» *Rna*, vol. 8, no 4, p. 478-496.
- Bommer, U.A. et Thiele, B.J. 2004. «The translationally controlled tumour protein (Tctp).» *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 36, p. 379-385.
- Bonati, M., Bortolus, R., Marchetti, F., Romero, M., Tognoni, G. 1990. «Drug use in pregnancy: an overview of epidemiological (Drug Utilization) Studies.» *Eur J Clin Pharmacol*, vol. 38, no 4, p. 325-328.
- Bond, H., Dilworth, M.R., Baker, B., Cowley, E., Requena Jimenez, A., Boyd, R.D., Husain, S.M., Ward, B.S., Sibley, C.P., Glazier, J.D. 2008. «Increased maternofetal calcium flux in parathyroid hormone-related protein-null mice.» *J Physiol*, no 586, p. 2015-2025.
- Borges, L.V., do Carmo Cancino, J.C., Peters, V.M., Las Casas, L., de Oliveira Guerra, M. 2005. «Development of pregnancy in rats treated with *Hypericum perforatum*.» *Phytother Res*, vol. 19, no 10, p. 885-887.
- Born, D. et Barron, M.L. 2005. «Herb use in pregnancy: what nurses should know.» *MCN Am J Matern Child Nurs*, vol. 30, no 3, 201-206; quiz 207-208.
- Boulton, T.G., Nye, S.H., Robbins, D.J., Ip, N.Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S.D., DePinho, R.A., Panayotatos, N., Cobb, M.H., Yancopoulos, G.D. 1991. «ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and Ngf.» *Cell*, vol. 65, no 4, p. 663-675.
- Boyd, J.D. et Hamilton, W.J. 1966. «Electron microscopic observations on the cytotrophoblast contribution to the syncytium in the human placenta.» *J Anat*, vol. 100, Pt3, p. 535-548.
- Brandes, J.M., Tavoloni, N., Potter, B.J., Sarkozi, L., Shepard, M.D., Berk, P.D. 1983. «A new recycling technique for human placental cotyledon perfusion: application to studies of the fetomaternal transfer of glucose, inulin, and antipyrine.» *Am J Obstet Gynecol*, vol. 146, no 7, p. 800-806.

- Brewster, J.L., de Valoir, T., Dwyer, N.D., Winter, E., Gustin, M.C. 1993. «An osmosensing signal transduction pathway in yeast.» *Science*, vol. 259, no 5102, p. 1760-1763.
- Bronner, F. 2001. «Extracellular and intracellular regulation of calcium homeostasis.» *ScientificWorldJournal*, vol. 1, p. 919-925.
- Brown, M.T. et Cooper, J.A. 1996. «Regulation, substrates and functions of Src.» *Biochim Biophys Acta*, vol. 1287, no 2-3, p. 121-149.
- Bruns, M.E., Overpeck, J.G., Smith, G.C., Hirsch, G.N., Mills, S.E., Bruns, D.E. 1988. «Vitamin D-dependent calcium binding protein in rat uterus: differential effects of estrogen, tamoxifen, progesterone, and pregnancy on accumulation and cellular localization.» *Endocrinology*, vol. 122, no 6, p. 2371-2378.
- Builder, S.E., Beavo, J.A. et Krebs, E.G. 1980. «Stoichiometry of cAMP and 1,N6-etheno-cAMP binding to protein kinase.» *J Biol Chem*, vol. 255, no 6, p. 2350-2354.
- Butterweck, V. 2003. «Mechanism of action of St John's Wort in depression : What Is Known?» *CNS Drugs*, vol. 17, no 8, p. 539-562.
- Butterweck, V., Christoffel, V., Nahrstedt, A., Petereit, F., Spengler, B., Winterhoff, H. 2003. «Step by step removal of hyperforin and hypericin: activity profile of different Hypericum preparations in behavioral models.» *Life Sci*, vol. 73, no. 5, p. 627-639.
- Butterweck, V., Nahrstedt, A., Evans, J., Hufeisen, S., Rauser, L., Savage, J., Popadak, B., Ernsberger, P., Roth, B.L. 2002. «In vitro receptor screening of pure constituents of St. John's Wort reveals novel interactions with a number of GPCRSs.» *Psychopharmacology (Berl)*, vol. 162, no 2, p. 193-202.
- Butterweck, V., Wall, A., Lieflander-Wulf, U., Winterhoff, H., Nahrstedt, A. 1997. «Effects of the total extract and fractions of *Hypericum perforatum* in animal assays for antidepressant activity.» *Pharmacopsychiatry*, vol. 30, Suppl 2, p. 117-124.
- Butterweck, V., Winterhoff, H. et Herkenham, M. 2003. «Hyperforin-containing extracts of St John's Wort fail to alter gene transcription in brain areas involved in HPA axis control in a long-term treatment regimen in rats.» *Neuropsychopharmacology*, vol. 28, no 12, p. 2160-2168.

- Campbell, S.L., Khosravi-Far, R., Rossman, K.L., Clark, G.J., Der, C.J. 1998. «Increasing complexity of Ras signaling.» *Oncogene*, vol. 17, no 11 reviews, p. 1395-1413.
- Camps, M., Nichols, A., Gillieron, C., Antonsson, B., Muda, M., Chabert, C., Boschert, U., Arkinstall, S. 1998. «Catalytic activation of the phosphatase MKP-3 by ERK2 mitogen-activated protein kinase.» *Science*, vol. 280, no 5367, p. 1262-1265.
- Canada, Santé. 2003. Loi Sur Les Aliments Et Drogues Règlement Sur Les Produits De Santé Naturels C.P. 2003-847, 5 Juin 2003 In: *D.g.d.p.d.s.e.d.a. Direction des produits de santé naturels*, Santé Canada (Ed.).
- Canagarajah, B.J., Khokhlatchev, A., Cobb, M.H., Goldsmith, E.J. 1997. «Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation.» *Cell*, vol. 90, no 5, p. 859-869.
- Carafoli, E. 1987. «Intracellular calcium homeostasis.» *Annu Rev Biochem*, vol. 56, p. 395-433.
- Carroll, M., Ohno-Jones, S., Tamura, S., Buchdunger, E., Zimmermann, J., Lydon, N.B., Gilliland, D.G., Druker, B.J. 1997. «Cgp 57148, a tyrosine kinase inhibitor, inhibits the growth of cells expressing Bcr-Abl, Tel-Abl, and Tel-Pdgfr fusion proteins.» *Blood*, vol. 90, no 12, p. 4947-4952.
- Carter, A.M. 2007. «Animal models of human placentation--a review.» *Placenta*, no 28, Suppl A, p. S41-47.
- Carvalho, A.C.B., Nunes, D.S.G., Baratelli, T.G., Mahmud, N.S., Shuqair, S.A.Q., Netto, E.M. 2007. «Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos.» *T&C Amazônia*, vol. 5, no 11, p. 26-32.
- Carvalho, G.J.A., Carvalho, M.G., Ferreira, D.T., Faria, T.J., Braz-Filho, R. 2001. «Diterpenes, triterpenes e esteróides das flores de *Wedelia Paludosa*.» *Quimica Nova*, vol. 24, no 1, p. 24-26.
- Casart, Y.C., Proverbio, T., Marin, R., Proverbio, F. 2000. «ca-ATPase of human syncytiotrophoblast basal plasma membranes.» *Arch Physiol Biochem*, vol. 108, no 4, p. 380-384.
- Castellucci, M., Kosanke, G., Verdenelli, F., Huppertz, B., Kaufmann, P. 2000. «Villous sprouting: fundamental mechanisms of human placental development.» *Hum Reprod Update*, vol. 6, no 5, p. 485-494.
- Cemerikic, B., Zamah, R., Ahmed, M.S. 1998. «Identification of L-type calcium channels associated with kappa opioid receptors in human placenta.» *J Mol Neurosci*, vol. 10, no 3, p. 261-272.

- Chakraborty, C., Gleeson, L.M., McKinnon, T., Lala, P.K. 2002. «Regulation of human trophoblast migration and invasiveness.» *Can J Physiol Pharmacol*, vol. 80, no 2, p. 116-124.
- Chang, L. et Karin, M. 2001. «Mammalian MAP Kinase signalling cascades.» *Nature*, vol. 410, no 6824, p. 37-40.
- Chao, Y.Y., Chen, I.S., Yeh, J.L., Chen, J.J., Ko, Y.C., Cheng, J.S., Liu, C.P., Lo, Y.K., Su, W., Chou, K.J., Chen, W.C., Jan, C.R. 2002. «Novel action of lignans isolated from *Hernandia nymphaeifolia* on Ca(2+) signaling in renal tubular cells.» *Eur J Pharmacol*, vol.17, no 443 (1-3), p. 31-8.
- Chaudhary, A., King, W.G., Mattaliano, M.D., Frost, J.A., Diaz, B., Morrison, D.K., Cobb, M.H., Marshall, M.S., Brugge, J.S. 2000. «Phosphatidylinositol 3-kinase regulates Raf1 through PAK phosphorylation of serine 338.» *Curr Biol*, vol. 10, no 9, p. 551-554.
- Chen, R.H., Sarnecki, C. et Blenis, J. 1992. «Nuclear localization and regulation of ERK- and RSK-encoded protein kinases.» *Mol Cell Biol*, vol. 12, no 3, p. 915-927.
- Chen, Z., Gibson, T.B., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., Wright, A., Vanderbilt, C., Cobb, M.H. 2001. «MAP Kinases.» *Chem Rev*, vol. 101, no 8, p. 2449-2476.
- Cheng, H.L. et Feldman, E.L. 1998. «Bidirectional regulation of P38 kinase, C-Jun N-terminal protein kinase by insulin-like growth factor-I.» *J Biol Chem*, vol. 273, no 23, p. 14560-14565.
- Cheng, K.W., Nathwani, P.S. et Leung, P.C. 2000. «Regulation of human gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression in placental cells.» *Endocrinology*, vol. 141, no 7, p. 2340-2349.
- Christakos, S., Gabrielides, C. et Rhoten, W.B. 1989. «Vitamin D-dependent calcium binding proteins: chemistry, distribution, functional considerations, and molecular biology.» *Endocr Rev*, vol. 10, no 1, p. 3-26.
- Cibulsky, S.M. et Sather, W.A. 1999. «Block by ruthenium red of cloned neuronal voltage-gated calcium channels.» *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 289, no 3, p. 1447-1453.
- Clarson, L.H., Roberts, V.H., Hamark, B., Elliott, A.C., Powell, T. 2003. «Store-operated Ca²⁺ entry in first trimester and term human placenta.» *J Physiol*, vol. 550, no Pt2, p. 515-528.
- Clerk, A. et Sugden, P.H. 1998. «The P38-MAPK inhibitor, SB203580, inhibits cardiac stress-activated protein kinases/C-Jun N-terminal kinases (Sapks/Jnks).» *FEBS Lett*, vol. 426, no 1, p. 93-96.

- Cohen, L.H., Pieterman, E., van Leeuwen, R.E., Du, J., Negre-Aminou, P., Valentijn, A.R., Overhand, M., van der Marel, G.A., van Boom, J.H. 1999. «Inhibition of human smooth muscle cell proliferation in culture by farnesyl pyrophosphate analogues, inhibitors of in vitro protein: farnesyl transferase.» *Biochem Pharmacol*, vol. 57, no 4, p. 365-373.
- Cohen, P. 1999. «The development and therapeutic potential of protein kinase inhibitors.» *Curr Opin Chem Biol*, vol. 3, no 4, p. 459-465.
- Cole, L.A., 2009. «New discoveries on the biology and detection of human chorionic gonadotropin.» *Reprod Biol Endocrinol* vol. 7, no 8, p. 8.
- Conceição, A., Takser, L. et Lafond, J. 2010. «Effect of St. John's Wort standardized extract and hypericin on in vitro placental calcium transport.» *Journal of Medicinal Food* (in press).
- Constância, M., Hemberger, M., Hughes, J., Dean, W., Ferguson-Smith, A., Fundele, R., Stewart, F., Kelsey, G., Fowden, A., Sibley, C., Reik, W. 2002. «Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth.» *Nature*, vol. 417, no 6892, p. 945-948.
- Cordenonsi, M., Montagner, M., Adorno, M., Zacchigna, L., Martello, G., Mamidi, A., Soligo, S., Dupont, S., Piccolo, S. 2007. «Integration of TGF-beta and Ras/MAPK signaling through P53 phosphorylation.» *Science*, vol. 315, no 5813, p. 840-843.
- Cornillon, J., Campos, L. et Guyotat, D. 2003. «Focal adhesion kinase (Fak), a multifunctional protein.» *Med Sci*, vol. 19, no 6-7, p. 743-752.
- Cos, P., Vlietinck, A.J., Berghe, D.V., Maes, L. 2006. «Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'.» *J Ethnopharmacol*, vol. 106, no 3, p. 290-302.
- Couderc, B., Dufy-Barbe, L. et Sartor, P. 1995. «Long-term effects of calcium availability on prolactin and protein synthesis in human decidual cells.» *Placenta*, vol. 16, no 6, p. 527-537.
- Coutifaris, C., Babalola, G.O., Abisogun, A.O., Kao, L.C., Chin, U., Vadillo-Ortega, F., Osheroff, J., Kliman, H.J., Strauss, J.F., 3rd. 1991. «In vitro systems for the study of human trophoblast implantation.» *Ann N Y Acad Sci*, vol. 622, p. 191-201.
- Cowley, S., Paterson, H., Kemp, P., Marshall, C.J. 1994. «Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells.» *Cell*, vol. 77, no 6, p. 841-852.
- Crisanti-Combes, P., Lorinet, A.M., Girard, A., Pessac, B., Wasseff, M., Calothy, G. 1982. «Expression of neuronal markers in chick and quail embryo neuroretina cultures infected with rous sarcoma virus.» *Cell Differ*, vol. 11, no 1, p. 45-54.

- Cross, J.C. 2000. «Genetic insights into trophoblast differentiation and placental morphogenesis.» *Semin Cell Dev Biol*, vol. 11, no 2, p. 105-113.
- Cross, J.C. 2005. «How to make a placenta: mechanisms of trophoblast cell differentiation in mice--a review.» *Placenta*, vol. 26 Suppl A, p. S3-9.
- Cross, J.C., Werb, Z. et Fisher, S.J. 1994. «Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle.» *Science*, vol. 266, no 5190, p. 1508-1518.
- Cruise, J.L., Cotecchia, S. et Michalopoulos, G. 1986. «Norepinephrine decreases EGF binding in primary rat hepatocyte cultures.» *J Cell Physiol*, vol. 127, no 1, p. 39-44.
- Cuenda, A., Rouse, J., Doza, Y.N., Meier, R., Cohen, P., Gallagher, T.F., Young, P.R., Lee, J.C. 1995. «SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1.» *FEBS Lett*, vol. 364, no 2, p. 229-233.
- Dai, R., Ali, M.K., Lezcano, N. et Bergson, C. 2008. «A crucial role for cAMP and protein kinase a in D1 dopamine receptor regulated intracellular calcium transients.» *Neurosignals*, vol. 16, no 2-3, p. 112-123.
- Dalton, P., Christian, H.C., Redman, C.W., Sargent, I.L., Boyd, C.A. 2007. «Membrane trafficking of Cd98 and its ligand galectin 3 in Bewo cells- implication for placental cell fusion.» *Febs J*, vol. 274, no 11, p. 2715-2727.
- Damasceno, D.C., Volpato, G.T., Sartori, T.C., Rodrigues, P.F., Perin, E.A., Calderon, I.M., Rudge, M.V. 2002. «Effects of *Annona squamosa* extract on early pregnancy in rats.» *Phytomedicine*, vol. 9, no 7, p. 667-672.
- Daoud, G., Amyot, M., Rassart, E., Masse, A., Simoneau, L., Lafond, J. 2005. «ERK1/2 and P38 regulate trophoblasts differentiation in human term placenta.» *J Physiol*, vol. 566, Pt2, p. 409-423.
- Daoud, G., Le bellego, F. et Lafond, J. 2008. «PP2 regulates human trophoblast cells differentiation by activating P38 and ERK1/2 and inhibiting FAK activation.» *Placenta*, vol. 29, no 10, p. 862-870.
- Daoud, G., Rassart, E., Masse, A., Lafond, J. 2006. «Src family kinases play multiple roles in differentiation of trophoblasts from human term placenta.» *J Physiol*, vol. 571, Pt3, p. 537-553.
- David, J.P., Silva, E.F., Moura, D.L., Guedes, M.L.S., Assunção, R.J., David, J.M. 2001. «Lignanas e triterpenos do extrato citotóxico de *Eriope blanchetii*.» *Química Nova*, vol. 24, n. 6, p. 730-733.

- Davies, S.P., Reddy, H., Caivano, M., Cohen, P. 2000. «Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors.» *Biochem J*, vol. 351, Pt1, p. 95-105.
- Davis, R.J. 2000. «Signal transduction by the JNK group of MAP kinases.» *Cell*, vol. 103, no 2, p. 239-252.
- De Boer, H. et Lamxay, V. 2009. «Plants used during pregnancy, childbirth and postpartum healthcare in Lao Pdr: a comparative study of the brou, saek and kry ethnic groups.» *J Ethnobiol Ethnomed*, vol. 5, p. 25.
- De Luca, V. et St Pierre, B. 2000. «The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis.» *Trends Plant Sci*, vol. 5, no 4, p. 168-173.
- Deak, M., Clifton, A.D., Lucocq, L.M., Alessi, D.R. 1998. «Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/P38, and may mediate activation of CREB.» *Embo J* vol. 17, no 15, p. 4426-4441.
- Delaveau, P. 1982. *Histoire Et Renouveau Des Plantes Médicinales*. Paris: Albin Michel.
- Dent, P., Yacoub, A., Fisher, P.B., Hagan, M.P., Grant, S. 2003. «MAPK pathways in radiation responses.» *Oncogene*, vol. 22, no 37, p. 5885-5896.
- Dérillard, B., Raingeaud, J., Barrett, T., Wu, I.H., Han, J., Ulevitch, R.J., Davis, R.J. 1995. «Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms.» *Science*, vol. 267, no 5198, p. 682-685.
- Di Leva, F., Domi, T., Fedrizzi, L., Lim, D. , Carafoli, E. 2008. «The plasma membrane Ca²⁺ ATPase of animal cells: structure, function and regulation.» *Arch Biochem Biophys*, vol. 476, no 1, p. 65-74.
- Diller, D.J., Lin, T.H. et Metzger, A. 2005. «The discovery of novel chemotypes of P38 kinase inhibitors.» *Curr Top Med Chem*, vol. 5, no 10, p. 953-965.
- Dinan, L., Harmatha, J. et Lafont, R. 2001. «Chromatographic procedures for the isolation of plant steroids.» *J Chromatogr A*, vol. 935, no 1-2, p. 105-123.
- Diviani, D. et Scott, J.D. 2001. «AKAP signaling complexes at the cytoskeleton.» *J Cell Sci*, vol. 114, no Pt8, p. 1431-1437.
- Diwu, Z. 1995. «Novel therapeutic and diagnostic applications of hypocrellins and hypericins.» *Photochem Photobiol*, vol. 61, no 6, p. 529-539.
- Djerassi, C., Gray, J.D. et Kingl, F.A. 1960. «Naturally occurring oxygen heterocycles. Ix. isolation and characterization of genipin.» *J. Org Chem*, vol. 25, p. 2174-2177.

- Du, H.-Y., Olivo, M., Mahendram, R., Huang, Q., Shen, H.-M., Ong, C.-N., Bay, B.H. 2007. «Hypericin photoactivation triggers down-regulation of matrix metalloproteinase-9 expression in well-differentiated human nasopharyngeal cancer cells.» *Cell Mol Life Sci*, vol. 64, 979-988.
- Dudley, D.T., Pang, L., Decker, S.J., Bridges, A.J., Saltiel, A.R. 1995. «A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade.» *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 92, no 17, p. 7686-7689.
- Dugoua, J.J., Mills, E., Perri, D., Koren, G. 2006. «Safety and efficacy of St. John's Wort (Hypericum) during pregnancy and lactation.» *Can J Clin Pharmacol*, vol. 13, no 3, p. e268-276.
- Egawa, M., Kamata, H., Kushiyama, A., Sakoda, H., Fujishiro, M., Horike, N., Yoneda, M., Nakatsu, Y., Ying, G., Jun, Z., Tsuchiya, Y., Takata, K., Kurihara, H., Asano, T. 2008. «Long-term forskolin stimulation induces AMPK activation and thereby enhances tight junction formation in human placental trophoblast Bewo cells.» *Placenta*, vol. 29, no 12, p. 1003-1008.
- Ehse, J.A., Casilla, V.R., Doty, T., Pospisilik, J.A., Winter, K.D., Demuth, H.U., Pederson, R.A., McIntosh, C.H. 2003. «Glucose-dependent insulinotropic polypeptide promotes beta-(Ins-1) cell survival via cyclic adenosine monophosphate-mediated caspase-3 inhibition and regulation of P38 mitogen-activated protein kinase.» *Endocrinology*, vol. 144, no 10, p. 4433-4445.
- Einarson, A., Lawrimore, T., Brand, P., Gallo, M., Rotatone, C., Koren, G. 2000. «Attitudes and practices of physicians and naturopaths toward herbal products, including use during pregnancy and lactation.» *Can J Clin Pharmacol*, vol. 7, no 1, p. 45-49.
- Elsabagh, S., Hartley, D.E., Ali, O., Williamson, E.M., File, S.E. 2005. «Differential cognitive effects of Ginkgo biloba after acute and chronic treatment in healthy young volunteers.» *Psychopharmacology*, vol. 179, no 2, p. 437-446.
- English, J.M., Vanderbilt, C.A., Xu, S., Marcus, S., Cobb, M.H. 1995. «Isolation of MEK5 and differential expression of alternatively spliced forms.» *J Biol Chem*, vol. 270, no 48, p. 28897-28902.
- Evain-Brion, D. 2001. Développement Du Trophoblaste. In: *Précis De Gynécologie-Obstétrique - Implantation Et Placentation*, J.-C.C. Philippe Merviel, Jean-Michel Foidart ... [et al.]. (Ed.), p. 13-22., Paris: Masson.
- Fan, G., Merritt, S.E., Kortjenann, M., Shaw, P.E., Holzman, L.B. 1996. «Dual leucine zipper-bearing kinase (DLK) activates P46SAPK and P38MAPK but not ERK2.» *J Biol Chem*, vol. 271, no 40, p. 24788-24793.

- Fang, Y. et Olah, M.E. 2007. «Cyclic AMP-dependent, protein kinase a-independent activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 following adenosine receptor stimulation in human umbilical vein endothelial cells: role of exchange protein activated by cAMP 1 (Epac1).» *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 322, no 3, p. 1189-1200.
- Feinman, M.A., Kliman, H.J., Caltabiano, S., Strauss, J.F., 3rd. 1986. «8-bromo-3',5'-adenosine monophosphate stimulates the endocrine activity of human cytotrophoblasts in culture.» *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 63, no 5, p. 1211-1217.
- Ferraz, A., Faria, D.H., Benneti, M.N., da Rocha, A.B., Schwartzmann, G., Henriques, A., von Poser, G.L. 2005. «Screening for antiproliferative activity of six southern Brazilian species of *Hypericum*.» *Phytomedicine* vol. 12, no 1-2, p. 112-115.
- Figueiredo, R.W., Maia, G.A., Holanda, L.F.F., Monteiro, J.C.S. 1986. «Características químicas e físicas do jenipapo.» *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, vol. 21, no 4, p. 421-428.
- Firenzuoli, F. et Gori, L. 2007. «Herbal medicine today: clinical and research issues.» *Evid Based Complement Alternat Med*, vol. 4, Sup 1, p. 37-40.
- Firn, R.D. et Jones, C.G. 2009. «A Darwinian view of metabolism: molecular properties determine fitness.» *J Exp Bot*, vol. 60, no 3, p. 719-726.
- Fisher, G.J., Kelley, L.K., Smith, C.H. 1987. «ATP-dependent calcium transport across basal plasma membranes of human placental trophoblast.» *Am J Physiol*, vol. 252, 1 Pt1, p. C38-46.
- Fisher, S.J., Cui, T.Y., Zhang, L., Hartman, L., Grahl, K., Zhang, G.Y., Tarpey, J., Damsky, C.H., 1989. «Adhesive and degradative properties of human placental cytotrophoblast cells in vitro.» *J Cell Biol*, vol. 109, no 2, p. 891-902.
- Fisunov, A., Lozovaya, N., Tsintsadze, T., Chatterjee, S., Noldner, M., Krishtal, O. 2000. «Hyperforin modulates gating of P-type Ca^{2+} current in cerebellar purkinje neurons.» *Pflugers Arch*, vol. 440, no 3, p. 427-434.
- Foltz, I.N., Lee, J.C., Young, P.R., Schrader, J.W. 1997. «Hemopoietic growth factors with the exception of interleukin-4 activate the P38 mitogen-activated protein kinase pathway.» *J Biol Chem*, vol. 272, no 6, p. 3296-3301.
- Forbes, K., Westwood, M., Baker, P.N., Aplin, J.D. 2008. «Insulin-like growth factor I and II regulate the life cycle of trophoblast in the developing human placenta.» *Am J Physiol Cell Physiol*, vol. 294, no 6, p. C1313-1322.
- Fray, J.C. et Park, C.S. 1986. «Forskolin and calcium: interactions in the control of renin secretion and perfusate flow in the isolated rat kidney.» *J Physiol*, vol. 375, p. 361-375.

- Freshney, N.W., Rawlinson, L., Guesdon, F., Jones, E., Cowley, S., Hsuan, J., Saklatvala, J., 1994. «Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of HSP27.» *Cell*, vol. 78, no 6, p. 1039-1049.
- Fullmer, C.S. et Wasserman, R.H. 1987. «Chicken intestinal 28-kilodalton calbindin-D: complete amino acid sequence and structural considerations.» *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 84, no 14, p. 4772-4776.
- Gachet, Y., Tournier, S., Lee, M., Lazaris-Karatzas, A., Poulton, T., Bommer, U.A. 1999. «The growth-related, translationally controlled protein P23 has properties of a tubulin binding protein and associates transiently with microtubules during the cell cycle.» *J Cell Sci*, vol. 112, Pt 8, p. 1257-1271.
- Gallagher, T.F., Seibel, G.L., Kassis, S., Laydon, J.T., Blumenthal, M.J., Lee, J.C., Lee, D., Boehm, J.C., Fier-Thompson, S.M., Abt, J.W., Soreson, M.E., Smietana, J.M., Hall, R.F., Garigipati, R.S., Bender, P.E., Erhard, K.F., Krog, A.J., Hofmann, G.A., Sheldrake, P.L., McDonnell, P.C., Kumar, S., Young, P.R., Adams, J.L. 1997. «Regulation of stress-induced cytokine production by pyridinylimidazoles: inhibition of CSBP kinase.» *Bioorg Med Chem*, vol. 5, no 1, p. 49-64.
- Ganai, G.N. et Jha, G.J. 1991. «Immunosuppression due to chronic *Lantana camara* L. toxicity in sheep.» *Indian J Exp Biol*, vol. 29, no 8, p. 762-766.
- Gao, J., Chen, J., Tang, X., Pan, L., Fang, F., Xu, L., Zhao, X., Xu, Q., 2006. «Mechanism underlying mitochondrial protection of asiatic acid against hepatotoxicity in mice.» *J Pharm Pharmacol*, vol. 58, no 2, p. 227-233.
- Gao, Q. et Ge, J. 2005. «The inhibition of Ca²⁺ influx induced by hypericin in cultured human retinal pigment epithelial cells analyzed by confocal imaging.» *Ophthalmic Res*, vol. 37, no 3, p. 128-135.
- Garnett, M.J., Rana, S., Paterson, H., Barford, D., Marais, R. 2005. «Wild-type and mutant B-Raf activate C-Raf through distinct mechanisms involving heterodimerization.» *Mol Cell*, vol. 20, no 6, p. 963-969.
- Garrington, T.P. et Johnson, G.L. 1999. «Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways.» *Curr Opin Cell Biol*, vol. 11, no 2, p. 211-218.
- Ghayur, M.N., Khan, A.H., Gilani, A.H. 2007. «Ginger facilitates cholinergic activity possibly due to blockade of muscarinic autoreceptors in rat stomach fundus.» *Pak J Pharm Sci*, vol. 20, no 3, p. 231-235.
- Ghisalberti, E.L. 2000. «*Lantana camara* L. (Verbenaceae).» *Fitoterapia*, vol. 71, no 5, p. 467-486.

- Gioti, E.M., Skalkos, D.C., Fiamegos, Y.C., Stalikas, C.D. 2005. «Single-drop liquid-phase microextraction for the determination of hypericin, pseudohypericin and hyperforin in biological fluids by high performance liquid chromatography.» *J Chromatogr A4*, vol. 1093, no 1-2, p. 1-10.
- Glover, D.D., Amonkar, M., Rybeck, B.F., Tracy, T.S. 2003. «Prescription, over-the-counter, and herbal medicine use in a rural, obstetric population.» *Am J Obstet Gynecol*, vol. 188, no 4, p. 1039-1045.
- Goel, R.K., Prabha, T., Kumar, M.M., Dorababu, M., Prakash, Singh, G. 2006. «Teratogenicity of *Asparagus racemosus* Willd. Root, a Herbal Medicine.» *Indian J Exp Biol*, vol. 44, no 7, p. 570-573.
- Goldsmith, E.J., Cobb, M.H., Chang, C.-I. 2004. Structure of MAPKs. In: *Map Kinase Signaling Protocols. Series: Methods in Molecular Biology*, R. Seger (Ed.), p. 127-143, Springer protocols.
- Goldsmith, Z.G. et Dhanasekaran, D.N. 2007. «G protein regulation of MAPK Networks.» *Oncogene*, vol. 26, no 22, p. 3122-3142.
- Gonzalez, F.A., Seth, A., Raden, D.L., Bowman, D.S., Fay, F.S., Davis, R.J. 1993. «Serum-induced translocation of mitogen-activated protein kinase to the cell surface ruffling membrane and the nucleus.» *J Cell Biol*, vol. 122, no 5, p. 1089-1101.
- Gorniak, S.L., Maiorka, P.C., Raspantini, P.C., Hosomi, R., Moraes, A.P., Dagli, M.L. 2003. «Assessment of the perinatal effects of maternal ingestion of *Solanum malacoxylon* in rats.» *Reprod Toxicol*, vol. 17, no 1, p. 67-72.
- Gould, G.W., Cuenda, A., Thomson, F.J., Cohen, P. 1995. «The activation of distinct mitogen-activated protein kinase cascades is required for the stimulation of 2-deoxyglucose uptake by interleukin-1 and insulin-like growth factor-1 in KB cells.» *Biochem J*, vol. 311, Pt 3, p. 735-738.
- Gross, B., Gaestel, M., Bohm, H., Bielka, H. 1989. «DNA sequence coding for a translationally controlled human tumor protein.» *Nucleic Acids Res*, vol. 17, no 20, p. 8367.
- Grove, K.A. et Lambert, J.D. 2010. «Laboratory, epidemiological, and human intervention studies show that tea (*Camellia sinensis*) may be useful in the prevention of obesity.» *J Nutr*, vol. 140, no 3, p. 446-53.
- Guarnaccia, R., Madyastha, K.M., Tegtmeyer, E., Coscia, C.J. 1972. «Geniposidic acid, an iridoid glucoside from *Genipa Americana*.» *Tetrahedron Lett*, vol. 50, p. 5125-5127.

- Guerini, D., Garcia-Martin, E., Zecca, A., Guidi, F., Carafoli, E. 1998. «The calcium pump of the plasma membrane: membrane targeting, calcium binding sites, tissue-specific isoform expression.» *Acta Physiol Scand*, Suppl 643, p. 265-273.
- Hadley, M. (Ed.), 2000. *Endocrinology*. 5^{ème} ed. London: Prentice-Hall, 608 p.
- Haggarty, P. 2002. «Placental regulation of fatty acid delivery and its effect on fetal growth-a review.» *Placenta*, vol. 23 Suppl A, S28-38.
- Hamel, A., Mergler, D., Takser, L., Simoneau, L., Lafond, J. 2003. «Effects of low concentrations of organochlorine compounds in women on calcium transfer in human placental syncytiotrophoblast.» *Toxicol Sci*, vol. 76, no 1, p. 182-189.
- Han, J., Lee, J.D., Bibbs, L. et Ulevitch, R.J. 1994. «A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells.» *Science*, vol. 265, no 5173, p. 808-811.
- Han, J., Lee, J.D., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J. 1993. «Endotoxin induces rapid protein tyrosine phosphorylation in 70z/3 cells expressing Cd14.» *J Biol Chem*, vol. 268, no 33, p. 25009-25014.
- Handwerger, S. et Aronow, B. 2003. «Dynamic changes in gene expression during human trophoblast differentiation.» *Recent Prog Horm Res*, vol. 58, p. 263-281.
- Hanks, S.K. et Quinn, A.M. 1991. «Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members.» *Methods Enzymol*, vol. 200, p. 38-62.
- Hanoune, J., Pouille, Y., Tzavara, E., Shen, T., Lipskaya, L., Miyamoto, N., Suzuki, Y., Defer, N. 1997. «Adenylyl cyclases: structure, regulation and function in an enzyme superfamily.» *Mol Cell Endocrinol*, vol. 128, no 1-2, p. 179-194.
- Harteneck, C., Plant, T.D. et Schultz, G. 2000. «From worm to man: three subfamilies of TRP channels.» *Trends Neurosci*, vol. 23, no 4, p. 159-166.
- Hausen, B.M. et Osmundsen, P.E. 1983. «Contact allergy to parthenolide in *Tanacetum parthenium* (L.) Schulz-Bip. (feverfew, Asteraceae) and cross-reactions to related sesquiterpene lactone containing Compositae species.» *Acta Derm Venereol*, vol. 63, no 4, p. 308-14.
- Hazzalin, C.A., Cano, E., Cuenda, A., Barratt, M.J., Cohen, P., Mahadevan, L.C. 1996. «P38/RK is essential for stress-induced nuclear responses: JNK/SAPKs and C-Jun/Atf-2 phosphorylation are insufficient.» *Curr Biol*, vol. 6, no 8, p. 1028-1031.

- Heazell, A.E., Taylor, N.N., Greenwood, S.L., Baker, P.N., Crocker, I.P. 2009. «Does altered oxygenation or reactive oxygen species alter cell turnover of BeWo choriocarcinoma cells?» *Reprod Biomed Online*, vol. 18, no 1, p. 111-119.
- Hecker, G., Lewis, D.L., Rausch, D.M., Jelsema, C.L. 1991. «Nerve-growth-factor-treated and V-Src-expressing PC12 cells: a model for neuronal differentiation.» *Biochem Soc Trans*, vol. 19, no 2, p. 385-386.
- Hegde, V.R., Pu, H., Patel, M., Das, P.R., Strizki, J., Gullo, V.P., Chou, C.C., Buevich, A.V., Chan, T.M. 2004. «Three new compounds from the plant *Lippia alva* as inhibitors of chemokine receptor 5 (CCR5).» *Bioorg Med Chem Lett*, vol. 14, no 21, p. 5339-42.
- Heidenreich, O., Neininger, A., Schrott, G., Zinck, R., Cahill, M.A., Engel, K., Kotlyarov, A., Kraft, R., Kostka, S., Gaestel, M., Nordheim, A. 1999. «MAPKAP kinase 2 phosphorylates serum response factor in vitro and in vivo.» *J Biol Chem*, vol. 274, no 20, p. 14434-14443.
- Henderson, L., Yue, Q.Y., Bergquist, C., Gerden, B., Arlett, P. 2002. «St John's wort (*Hypericum perforatum*): drug interactions and clinical outcomes.» *Br J Clin Pharmacol*, vol. 54, no 4, p. 349-56.**
- Henriques, A.T., Kerber, V.A., Moreno, P.R.H. 1999. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: *Farmacognosia - Da Planta Ao Medicamento*, Simoes, et al. Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/Ed. UFCS, , p. 641-656.
- Henry, J.R., Rupert, K.C., Dodd, J.H., Turchi, I.J., Wadsworth, S.A., Cavender, D.E., Schafer, P.H., Siekierka, J.J. 1998. «Potent inhibitors of the MAP kinase P38.» *Bioorg Med Chem Lett*, vol. 8, no 23, p. 3335-3340.
- Hershberger, M.E. et Tuan, R.S. 1998. «Placental 57-KDa Ca(2+)-binding protein: regulation of expression and function in trophoblast calcium transport.» *Dev Biol*, vol. 199, no 1, p. 80-92.
- Hertz, R. 1959. «Choriocarcinoma of women maintained in serial passage in hamster and rat.» *Proc Soc Exp Biol Med* vol. 102, p. 77-81.
- Hilf, G. et Merz, W.E. 1989. «Influence of cyclic nucleotides on the processing of the carbohydrate part of the alpha-subunit of human choriogonadotropin by first trimester human placenta tissue.» *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 159, no 1, p. 26-33.
- Hill, E.P. et Longo, L.D. 1980. «Dynamics of maternal-fetal nutrient transfer.» *Fed Proc*, vol. 39, no 2, p. 239-244.
- Hiller, K.-O. et Zetler, G. 1998. «Neuropharmacological studies on ethanol extracts of *Valeriana officinalis* L.: behavioural and anticonvulsant properties.» *Phytotherapy Research*, vol. 10, no 2, p. 145 – 151.

- Hirai, S., Katoh, M., Terada, M., Kyriakis, J.M., Zon, L.I., Rana, A., Avruch, J., Ohno, S. 1997. «MST/MLK2, a member of the mixed lineage kinase family, directly phosphorylates and activates SEK1, an activator of C-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase.» *J Biol Chem*, vol. 272, no 24, p. 15167-15173.
- Hobbs, C.A., Deterding, L.J., Perera, L., Bobay, B.G., Thompson, R.J., Darden, T.A., Cavanagh, J., Tomer, K.B. 2009. «Structural characterization of the conformational change in calbindin-D28k upon calcium binding using differential surface modification analyzed by mass spectrometry.» *Biochemistry*, vol. 48, no 36, p. 8603-8614.
- Hoenderop, J.G., Nilius, B. et Bindels, R.J. 2005. «Calcium absorption across epithelia.» *Physiol Rev*, vol. 85, no 1, p. 373-422.
- Hoenderop, J.G., van der Kemp, A.W., Hartog, A., van Os, C.H., Willems, P.H., Bindels, R.J. 1999. «The epithelial calcium channel, Ecac, is activated by hyperpolarization and regulated by cytosolic calcium.» *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 261, no 2, p. 488-492.
- Hoenderop, J.G., Vennekens, R., Muller, D., Prenen, J., Droogmans, G., Bindels, R.J., Nilius, B. 2001. «Function and expression of the epithelial Ca²⁺ channel family: comparison of mammalian Ecac1 and 2.» *J Physiol*, vol. 537, Pt3, p. 747-761.
- Hoenderop, J.G., Voets, T., Hoefs, S., Weidema, F., Prenen, J., Nilius, B., Bindels, R.J. 2003. «Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6.» *Embo J*, vol. 22, no 4, p. 776-785.
- Holst, L., Nordeng, H. et Haavik, S. 2008. «Use of herbal drugs during early pregnancy in relation to maternal characteristics and pregnancy outcome.» *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, vol. 17, no 2, p. 151-159.
- Hsu, W.L., Chen, Y.H., Chao, K.C., Chang, S.P., Tsui, K.H., Li, H.Y., Sung, Y.J. 2008. «Anti-Fas activating antibody enhances trophoblast outgrowth on endometrial epithelial cells by induction of P38 MAPK/Jnk-mediated apoptosis.» *Placenta*, vol. 29, no 4, p. 338-346.
- Hu, M.C., Wang, Y.P., Mikhail, A., Qiu, W.R., Tan, T.H. 1999. «Murine P38-delta mitogen-activated protein kinase, a developmentally regulated protein kinase that is activated by stress and proinflammatory cytokines.» *J Biol Chem*, vol. 274, no 11, p. 7095-7102.
- Huang, C.K., Zhan, L., Ai, Y., Jongstra, J. 1997. «Lsp1 is the major substrate for mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 in human neutrophils.» *J Biol Chem*, vol. 272, no 1, p. 17-19.
- Huguenard, J.R. 1998. «Low-voltage-activated (T-Type) calcium-channel genes identified.» *Trends Neurosci*, vol. 21, no 11, p. 451-452.

- Huppertz, B., Bartz, C. et Kokozidou, M. 2006. «Trophoblast fusion: fusogenic proteins, syncytins and adams, and other prerequisites for syncytial fusion.» *Micron*, vol. 37, no 6, p. 509-517.
- Husain, S.M. et Mughal, M.Z. 1992. «Mineral transport across the placenta.» *Arch Dis Child*, vol. 67, Spec no 7, p. 874-878.
- Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., ten Dijke, P., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsumoto, K., Miyazono, K., Gotoh, Y. 1997. «Induction of apoptosis by Ask1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and P38 signaling pathways.» *Science*, vol. 275, no 5296, p. 90-94.
- Inoki, K., Haneda, M., Ishida, T., Mori, H., Maeda, S., Koya, D., Sugimoto, T., Kikkawa, R. 2000. «Role of mitogen-activated protein kinases as downstream effectors of transforming growth factor-beta in mesangial cells.» *Kidney Int Suppl*, vol. 77, S76-80.
- Iriti, M. et Faoro, F. 2009. «Chemical diversity and defence metabolism: how plants cope with pathogens and ozone pollution.» *Int J Mol Sci*, vol. 10, no 8, p. 3371-3399.
- Ito, M., Yoshioka, K., Akechi, M., Yamashita, S., Takamatsu, N., Sugiyama, K., Hibi, M., Nakabeppu, Y., Shiba, T., Yamamoto, K.I. 1999. «JSAP1, a novel Jun N-terminal protein kinase (JNK)-binding protein that functions as a scaffold factor in the JNK signaling pathway.» *Mol Cell Biol*, vol. 19, no 11, p. 7539-7548.
- Izzo, A.A. et Ernst, E. 2001. «Interactions between herbal medicines and prescribed drugs: a systematic review.» *Drugs*, vol. 61, no 15, p. 2163-75.**
- Izzo, A.A., Di Carlo, G., Borrelli, F., Ernst, E. 2005. «Cardiovascular pharmacotherapy and herbal medicines: the risk of drug interaction.» *Int J Cardiol*, vol. 98, no 1, p. 1-14.
- Jacobson, J.M., Feinman, L., Liebes, L., Ostrow, N., Koslowski, V., Tobia, A., Cabana, B.E., Lee, D., Spritzler, J., Prince, A.M. 2001. «Pharmacokinetics, safety, and antiviral effects of hypericin, a derivative of St. John's Wort plant, in patients with chronic hepatitis C virus infection.» *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 45, no 2, p. 517-524.
- Jakoubek, V., Bibova, J. et Hampl, V. 2006. «Voltage-gated calcium channels mediate hypoxic vasoconstriction in the human placenta.» *Placenta*, vol. 27, no 9-10, p. 1030-1033.
- Jansson, T. et Powell, T.L. 2006. «IFPA 2005 award in placentology lecture. Human placental transport in altered fetal growth: does the placenta function as a nutrient sensor? - a review.» *Placenta*, vol. 27, Suppl A, S91-97.
- Jarvis, W.D. et Grant, S. 1999. «Protein kinase C targeting in antineoplastic treatment strategies.» *Invest New Drugs*, vol. 17, no 3, p. 227-240.

- Jean, D., Pouligon, M. et Henriot, A.C. 2006. «Pharmacological activity of three Commercial *Hypericum perforatum* preparations in mice.» *Phytother Res*, vol. 20, no 8, p. 653-654.
- Jeong, D.W., Kim, Y.H., Kim, H.H., Ji, H.Y., Yoo, S.D., Choi, W.R., Lee, S.M., Han, C.K., Lee, H.S. 2007. «Dose-linear pharmacokinetics of oleanolic acid after intravenous and oral administration in rats.» *Biopharm Drug Dispos*, vol. 28, no 2, p. 51-57.
- Ji, H.Y., Shin, B.S., Jeong, D.W., Park, E.J., Park, E.S., Yoo, S.D., Lee, H.S. 2009. «Interspecies scaling of oleanolic acid in mice, rats, rabbits and dogs and prediction of human pharmacokinetics.» *Arch Pharm Res*, vol.32, no 2, p. 251-257.
- Jia L, Zhao Y et Liang XJ. 2009. «Current evaluation of the millennium phytomedicine- ginseng (II): Collected chemical entities, modern pharmacology, and clinical applications emanated from traditional Chinese medicine.» *Curr Med Chem*, vol. 16, no 22, p. 2924-42.
- Jiang, Y., Li, Z., Schwarz, E.M., Lin, A., Guan, K., Ulevitch, R.J., Han, J. 1997. «Structure-function studies of P38 mitogen-activated protein kinase - loop 12 influences substrate specificity and autophosphorylation, but not upstream kinase selection.» *J Biol Chem*, vol. 272, no 17, p. 11096-11102.
- Jin, U.H., Kim, D.I., Lee, T.K., Lee, D.N., Kim, J.K., Lee, I.S., Kim, C.H. 2006. «Herbal formulation, yukmi-jihang-tang-jahage, regulates bone resorption by inhibition of phosphorylation mediated by tyrosine kinase Src and cyclooxygenase expression.» *J Ethnopharmacol*, vol. 106, no 3, p. 333-343.
- Johnstone, E.D., Sibley, C.P., Lowen, B., Guilbert, L.J. 2005. «Epidermal growth factor stimulation of trophoblast differentiation requires MAPK11/14 (P38 MAP kinase) Activation.» *Biol Reprod*, vol. 73, no 6, p. 1282-1288.
- Johnson, G.L. et Lapadat, R. 2002. «Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases.» *Science*, 2002 vol. 298, no 5600, p. 1911-1912.
- Juliao, L.D., Leitao, S.G., Lotti, C., Picinelli, A.L., Rastrelli, L., Fernandes, P.D., Noel, F., Thibaut, J.P., Leitao, G.G. 2009a. «Flavones and phenylpropanoids from a sedative extract of *Lantana trifolia* L.» *Phytochemistry*, vol. 71, no 2-3, p. 294-300.
- Juliao, L.D., Picinelli, A.L., Marzocco, S., Leitao, S.G., Lotti, C., Autore, G., Rastrelli, L. 2009b. «Phenylethanoid glycosides from *Lantana fucata* with in vitro anti-inflammatory activity.» *J Nat Prod*, vol. 72, no 8, p. 1424-1428.
- Kaabeche, K., Lemonnier, J., Le Mee, S., Caverzasio, J., Marie, P.J. 2004. Cbl-Mediated «Degradation of Lyn and Fyn induced by constitutive fibroblast growth factor receptor-2 activation supports osteoblast differentiation.» *J Biol Chem*, vol. 279, no 35, p. 36259-36267.

- Kalmes, A., Deou, J., Clowes, A.W., Daum, G. 1999. «Raf-1 is activated by the P38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, SB203580.» *FEBS Lett*, vol. 444, no 1, p. 71-74.
- Kamath, S.G. et Smith, C.H. 1994. «Na⁺/Ca²⁺ exchange, Ca²⁺ binding, and electrogenic Ca²⁺ transport in plasma membranes of human placental syncytiotrophoblast.» *Pediatr Res*, vol. 36, no 2, p. 461-467.
- Kamath, S.G., Haider, N. et Smith, C.H. 1994. «ATP independent calcium transport and binding by basal plasma membrane of human placenta.» *Placenta*, vol. 15, no 4, p. 147-155.
- Kamath, S.G., Kelley, L.K., Friedman, A.F., Smith, C.H. 1992. «Transport and Binding in Calcium Uptake by Microvillous Membrane of Human Placenta.» *Am J Physiol*, vol. 262, 3Pt1, C789-794.
- Kamei, T., Hamlin, G.P., Chapman, B.M., Burkhardt, A.L., Bolen, J.B., Soares, M.J. 1997. «Signaling pathways controlling trophoblast cell differentiation: Src family protein tyrosine kinases in the rat.» *Biol Reprod*, vol. 57, no 6, p. 1302-1311.
- Kaminska, B. 2005. «MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy-from molecular mechanisms to therapeutic benefits.» *Biochim Biophys Acta*, vol. 1754, no 1-2, p. 253-262.
- Kang, M.A., Yun, S.Y. et Won, J. 2003. «Rosmarinic acid inhibits Ca²⁺-dependent pathways of T-cell antigen receptor-mediated signaling by inhibiting the PLC-gamma 1 and Itk activity.» *Blood*, vol. 101, no 9, p. 3534-42.
- Kanne, J.P., Lalani, T.A., Fligner, C.L. 2005. «The placenta revisited: radiologic-pathologic correlation.» *Curr Probl Diagn Radiol*, vol. 34, no 6, p. 238-255.
- Karin, M. 1998. «Mitogen-activated protein kinase cascades as regulators of stress responses.» *Ann NY Acad Sci*, vol. 851, p. 139-146.
- Katz, M., Amit, I. et Yarden, Y., 2007. «Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases.» *Biochim Biophys Acta*, vol. 1773, no 8, p. 1161-1176.
- Kawasaki, H., Nakayama, S., Kretsinger, R.H. 1998. «Classification and evolution of EF-hand proteins.» *Biometals*, vol. 11, no 4, p. 277-295.
- Keeler, C. 1964. «*Genipa americana* in native tropical medicina.» *Dermatol Trop Ecol Geog*, vol. 28, p. 104-107.
- Keesler, G.A., Bray, J., Hunt, J., Johnson, D.A., Gleason, T., Yao, Z., Wang, S.W., Parker, C., Yamane, H., Cole, C., Lichenstein, H.S. 1998. Purification and Activation of Recombinant P38 Isoforms Alpha, Beta, Gamma, and Delta.» *Protein Expr Purif*, vol.14, no 2, p. 221-228.

- Kelkar, N., Gupta, S., Dickens, M., Davis, R.J., 2000. «Interaction of a mitogen-activated protein kinase signaling module with the neuronal protein JIP3.» *Mol Cell Biol*, vol. 20, no 3, p. 1030-1043.
- Kelm, M.A., Nair, M.G., Strasburg, G.M., DeWitt, D.L. 2000. «Antioxidant and cyclooxygenase inhibitory phenolic compounds from *Ocimum sanctum* Linn.» *Phytomedicine*, vol. 7, no 1, p. 7-13.
- Kerb, R., Brockmoller, J., Staffeldt, B., Ploch, M., Roots, I. 1996. «Single-dose and steady-state pharmacokinetics of hypericin and pseudohypericin.» *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 40, no 9, p. 2087-2093.
- Keryer, G., Alsat, E., Tasken, K., Evain-Brion, D. 1998. «Cyclic AMP-dependent protein kinases and human trophoblast cell differentiation in vitro.» *J Cell Sci*, vol. 111, Pt 7, p. 995-1004.
- Kharbanda, S., Yuan, Z.M., Weichselbaum, R., Kufe, D. 1998. «Determination of cell fate by C-Abl activation in the response to DNA damage.» *Oncogene*, vol. 17, no 25, p. 3309-3318.
- Khokhlatchev, A.V., Canagarajah, B., Wilsbacher, J., Robinson, M., Atkinson, M., Goldsmith, E., Cobb, M.H. 1998. «Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation.» *Cell*, vol. 93, no 4, p. 605-615.
- Kim, J.K., So, H., Youn, M.J., Kim, H.J., Kim, Y., Park, C., Kim, S.J., Ha, Y.A., Chai, K.Y., Kim, S.M., Kim, K.Y., Park, R., 2007. «*Hibiscus sabdariffa* L. water extract inhibits the adipocyte differentiation through the PI3-K and MAPK pathway.» *J Ethnopharmacol*, vol. 114, no 2, p. 260-267.
- Kim, M., Jung, Y., Lee, K., Kim, C. 2000. «Identification of the calcium binding sites in translationally controlled tumor protein.» *Arch Pharm Res*, vol. 23, no 6, p. 633-636.
- Kimura, Y., Okuda, H., Okuda, T., Hatano, T., Arichi, S. 1987. «Studies on the activities of tannins and related compounds, X. Effects of caffeetannins and related compounds on arachidonate metabolism in human polymorphonuclear leukocytes.» *J Nat Prod*, vol. 50, no 3, p. 392-9.
- King, A.J., Sun, H., Diaz, B., Barnard, D., Miao, W., Bagrodia, S., Marshall, M.S. 1998. «The protein kinase PAK3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338.» *Nature*, vol. 396, no 6707, p. 180-183.
- Kip, S.N., Gray, N.W., Burette, A., Canbay, A., Weinberg, R.J., Strehler, E.E. 2006. «Changes in the expression of plasma membrane calcium extrusion systems during the maturation of hippocampal neurons.» *Hippocampus*, vol. 16, no 1, p. 20-34.

- Kiselyov, K., Mignery, G.A., Zhu, M.X., Muallem, S., 1999. «The N-terminal domain of the IP3 receptor gates store-operated HTRP3 channels.» *Mol Cell*, vol. 4, no 3, p. 423-429.
- Kliman, H.J., Nestler, J.E., Sermasi, E., Sanger, J.M., Strauss, J.F., 3rd. 1986. «Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae.» *Endocrinology*, vol. 118, no 4, p. 1567-1582.
- Knöfler, M., Vasicek, R. et Schreiber, M. 2001. «Key regulatory transcription factors involved in placental trophoblast development-a review.» *Placenta*, vol. 22, Suppl A, S83-92.
- Kocanova, S., Buytaert, E., Matroule, J.Y., Piette, J., Golab, J., de Witte, P., Agostinis, P. 2007. «Induction of heme-oxygenase 1 requires the P38MAPK and PI3k pathways and suppresses apoptotic cell death following hypericin-mediated photodynamic therapy.» *Apoptosis*, vol. 12, no 4, p. 731-741.
- Kohler, P.O. et Bridson, W.E. 1971. «Isolation of hormone-producing clonal lines of human choriocarcinoma.» *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 32, no 5, p. 683-687.
- Kohler, P.O., Bridson, W.E., Hammond, J.M., Weintraub, B., Kirschner, M.A., Van Thiel, D.H. 1971. «Clonal lines of human choriocarcinoma cells in culture.» *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)*, vol. 153, p. 137-153.
- Kojetin, D.J., Venters, R.A., Kordys, D.R., Thompson, R.J., Kumar, R., Cavanagh, J. 2006. «Structure, binding interface and hydrophobic transitions of Ca²⁺-loaded calbindin-D (28k).» *Nat Struct Mol Biol*, vol. 13, no 7, p. 641-647.
- Kolch, W., Heidecker, G., Kochs, G., Hummel, R., Vahidi, H., Mischak, H., Finkenzeller, G., Marme, D., Rapp, U.R., 1993. «Protein kinase C alpha activates Raf-1 by direct phosphorylation.» *Nature*, 364, no 6434, 249-252.
- Komoroski, B.J., Zhang, S., Cai, H., Hutzler, J.M., Frye, R., Tracy, T.S., Strom, S.C., Lehmann, T., Ang, C.Y., Cui, Y.Y., Venkataramanan, R. 2004. «Induction and inhibition of cytochromes P450 by the St. John's wort constituent hyperforin in human hepatocyte cultures.» *Drug Metab Dispos*, vol. 32, no 5, p. 512-518.
- Kopperud, R., Christensen, A.E., Kjarland, E., Viste, K., Kleivdal, H., Doskeland, S.O. 2002. «Formation of inactive cAMP-saturated holoenzyme of cAMP-dependent protein kinase under physiological conditions.» *J Biol Chem*, vol. 277, no 16, p. 13443-13448.
- Kosk-Kosicka, D. et Zylinska, L. 1997. «Protein kinase C and calmodulin effects on the plasma membrane Ca²⁺-ATPase from excitable and nonexcitable cells.» *Mol Cell Biochem*, vol. 173, no 1-2, p. 79-87.

- Kovach, J.S., Ames, M.M., Powis, G., Moertel, C.G., Hahn, R.G., Creagan, E.T. 1979. «Toxicity and pharmacokinetics of a pyrrolizidine alkaloid, indicine N-oxide, in humans.» *Cancer Res*, vol. 39, no 11, p. 4540-4.
- Kovacs, C.S., Lanske, B., Hunzelman, J.L., Guo, J., Karaplis, A.C., Kronenberg, H.M. 1996. «Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) regulates fetal-placental calcium transport through a receptor distinct from the PTH/PTHrP receptor.» *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 93, no 26, p. 15233-15238.
- Kovo, M. et Golan, A. 2008. «In vitro models using the human placenta to study fetal exposure to drugs.» *Clinical Medicine: Reproductive Health*, vol. 2, p. 15-24.
- Kozasa, T. et Gilman, A.G. 1995. «Purification of recombinant G proteins from SF9 cells by hexahistidine tagging of associated subunits. Characterization of alpha 12 and inhibition of adenylyl cyclase by alpha Z.» *J Biol Chem*, vol. 270, no 4, p. 1734-1741.
- Kraus, G.A., Pratt, D., Tossberg, J., Carpenter, S. 1990. «Antiretroviral activity of synthetic hypericin and related analogs.» *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 172, no 1, p. 149-153.
- Kretsinger, R.H. 1980a. «Crystallographic studies of calmodulin and homologs.» *Ann N Y Acad Sci*, vol. 356, p. 14-19.
- Kretsinger, R.H. 1980b. «Structure and evolution of calcium-modulated proteins.» *CRC Crit Rev Biochem*, vol. 8, no 2, p. 119-174.
- Krishtal, O., Lozovaya, N., Fisunov, A., Tsintsadze, T., Pankratov, Y., Kopanitsa, M., Chatterjee, S.S. 2001. «Modulation of ion channels in rat neurons by the constituents of *Hypericum perforatum*.» *Pharmacopsychiatry*, vol. 34, S74-S82.
- Kudaka, W., Oda, T., Jinno, Y., Yoshimi, N., Aoki, Y. 2008. «Cellular localization of placenta-specific human endogenous retrovirus (HERV) transcripts and their possible implication in pregnancy-induced hypertension.» *Placenta*, vol. 29, no 3, p. 282-289.
- Kudo, Y., Boyd, C.A., Millo, J., Sargent, I.L., Redman, C.W. 2003. «Manipulation of Cd98 expression effects both trophoblast cell fusion and amino acid transport activity during syncytialization of human placental BeWo cells.» *J Physiol*, vol. 550, Pt1, p. 3-9.
- Kültz, D. et Burg, M. 1998. «Evolution of osmotic stress signaling via MAP kinase cascades.» *J Exp Biol*, vol. 201, no Pt22, p. 3015-3021.
- Kumar, S., McDonnell, P.C., Gum, R.J., Hand, A.T., Lee, J.C., Young, P.R. 1997. «Novel homologues of CSBP/P38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles.» *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 235, no 3, p. 533-538.

- Kuo, W.H., Chou, F.P., Young, S.C., Chang, Y.C., Wang, C.J. 2005. «Geniposide activates GSH S-transferase by the induction of GST M1 and GST M2 subunits involving the transcription and phosphorylation of MEK-1 signaling in rat hepatocytes.» *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 208, no 2, p. 155-162.
- Kutchan, T.M. 1995. «Alkaloid biosynthesis [mdash] the basis for metabolic engineering of medicinal plants.» *Plant Cell*, vol. 7, no 7, p. 1059-1070.
- Kyriakis, J.M. et Avruch, J. 2001. «Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation.» *Physiol Rev*, vol. 81, no 2, p. 807-869.
- Lacroix, M.C., Guibourdenche, J., Frendo, J.L., Muller, F., Evain-Brion, D. 2002a. «Human placental growth hormone - a review.» *Placenta*, vol. 23, Suppl A, S87-94.
- Lacroix, M.C., Guibourdenche, J., Frendo, J.L., Pidoux, G., Evain-Brion, D. 2002b. «Placental growth hormones.» *Endocrine*, vol. 19, no 1, p. 73-79.
- Lafond, J. et Simoneau, L. 2006. «Calcium homeostasis in human placenta: role of calcium-handling proteins.» *Int Rev Cytol*, vol. 250, p. 109-174.
- Lafond, J., Goyer-O'Reilly, I., Laramee, M, Simoneau, L., 2001. «Hormonal regulation and implication of cell signaling in calcium transfer by placenta.» *Endocrine*, vol. 14, no 3, p. 285-294.
- Lafond, J., Hamel, A., Takser, L., Vaillancourt, C., Mergler, D. 2004. «Low environmental contamination by lead in pregnant women: effect on calcium transfer in human placental syncytiotrophoblasts.» *J Toxicol Environ Health A*, vol. 67, no. 14, p. 1069-1079.
- Lafond, J., Leclerc, M. et Brunette, M.G. 1991. «Characterization of calcium transport by basal plasma membranes from human placental syncytiotrophoblast.» *J Cell Physiol*, vol. 148, no 1, p. 17-23.
- Lafond, J., Moukdar, F., Rioux, A., Ech-Chadli, H., Brissette, L., Robidoux, J., Masse, A. , Simoneau, L. 2000. «Implication of ATP and sodium in arachidonic acid incorporation by placental syncytiotrophoblast brush border and basal plasma membranes in the human.» *Placenta*, vol. 21, no 7, p. 661-669.
- Lafond, J., Simoneau, L., Savard, R., Lajeunesse, D. 1994. «Calcitonin receptor in human placental syncytiotrophoblast brush border and basal plasma membranes.» *Mol Cell Endocrinol*, vol. 99, no 2, p. 285-292.
- Lali, F.V., Hunt, A.E., Turner, S.J., Foxwell, B.M. 2000. «The pyridinyl imidazole inhibitor SB203580 blocks phosphoinositide-dependent protein kinase activity, protein kinase B phosphorylation, and retinoblastoma hyperphosphorylation in interleukin-2-stimulated T cells

- independently of P38 mitogen-activated protein kinase.» *J Biol Chem*, vol. 275, no 10, p. 7395-7402.
- LaMarca, H.L., Dash, P.R., Vishnuthavan, K., Harvey, E., Sullivan, D.E., Morris, C.A. , Whitley, G.S. 2008. Epidermal Growth Factor-Stimulated Extravillous Cytotrophoblast Motility Is Mediated by the Activation of Pi3-K, Akt and Both P38 and P42/44 Mitogen-Activated Protein Kinases.» *Hum Reprod*, vol. 23, no 8, p. 1733-1741.
- Lambers, T.T., Mahieu, F., Oancea, E., Hoofd, L., de Lange, F., Mensenkamp, A.R., Voets, T., Nilius, B., Clapham, D.E., Hoenderop, J.G. , Bindels, R.J. 2006. «Calbindin-D28k dynamically controls TRPV5-mediated Ca²⁺ transport.» *Embo J*, vol. 25, no 13, p. 2978-2988.
- Lanoix, D., Ouellette, R. et Vaillancourt, C. 2006. «Expression of melatonergic receptors in human placental choriocarcinoma cell lines.» *Hum Reprod*, vol. 21, no 8, p. 1981-1989.
- Lauthier, F., Taillet, L., Trouillas, P., Delage, C., Simon, A. 2000. «Ursolic acid triggers calcium-dependent apoptosis in human Daudi cells.» *Anticancer Drugs*, vol. 11, no 9, p. 737-745.
- Le Bellego, F., Vaillancourt, C. et Lafond, J. 2009. «Isolation and culture of term human cytotrophoblast cells and in vitro methods for studying human cytotrophoblast cells' calcium uptake.» *Methods Mol Biol*, vol. 550, p. 73-87.
- Leathwood, P.D. et Chauffard, F. 1985. «Aqueous extract of valerian reduces latency to fall asleep in man.» *Planta Medica*, vol. 51, p. 144-148.
- Lee, J.C., Griswold, D.E., Votta, B., Hanna, N. 1988. «Inhibition of monocyte IL-1 production by the anti-inflammatory compound, Sk&F 86002.» *Int J Immunopharmacol*, vol. 10, no 7, p. 835-843.
- Lee, J.C., Kassis, S., Kumar, S., Badger, A., Adams, J.L. 1999. «P38 mitogen-activated protein kinase inhibitors - mechanisms and therapeutic potentials.» *Pharmacol Ther*, vol. 82, no 2-3, p. 389-397.
- Lee, J.C., Laydon, J.T., McDonnell, P.C., Gallagher, T.F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M.J., Heys, J.R., Landvatter, S.W., et al. 1994. «A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis.» *Nature*, vol. 372, no 6508, p. 739-746.
- Lee, J.C., Rebar, L. et Laydon, J.T. 1989. «Effect of Sk&F 86002 on cytokine production by human monocytes.» *Agents Actions*, vol. 27, no 3-4, p. 277-279.
- Lee, J.J., Jin, Y.R., Lim, Y., Yu, J.Y., Kim, T.J., Yoo, H.S., Shin, H.S., Yun, Y.P. 2007. «Oleanolic acid, a pentacyclic triterpenoid, induces rabbit platelet aggregation through a

- phospholipase C-calcium dependent signaling pathway.» *Arch Pharm Res*, vol. 30, no 2, p. 210-214.
- Lee, M.R. et Dominguez, C. 2005. «MAP Kinase P38 inhibitors: clinical results and an intimate look at their interactions with P38alpha protein.» *Curr Med Chem*, vol. 12, no 25, p. 2979-2994.
- Legifrance, C.d.l.s.p.-. 2007. Article L4211-1 Modifié Par Ordonnance N°2007-613 Du 26 Avril 2007 - Art. 26 Jorf 27.
- Leiser, R. et Kaufmann, P. 1994. «Placental structure: in a comparative aspect.» *Exp Clin Endocrinol*, vol. 102, no 3, p. 122-134.
- Lenormand, P., Sardet, C., Pages, G., L'Allemain, G., Brunet, A., Pouyssegur, J. 1993. «Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (P42AMPK and P44MAPK) but not of their activator MAP kinase kinase (P45MAPKK) in fibroblasts.» *J Cell Biol*, vol. 122, no 5, p. 1079-1088.
- Li, F., Zhang, D. et Fujise, K. 2001. «Characterization of fortilin, a novel antiapoptotic protein.» *J Biol Chem*, vol. 276, no 50, p. 47542-47549.
- Li, H., Dakour, J., Guilbert, L.J., Winkler-Lowen, B., Lyall, F., Morrish, D.W. 2005. «PL74, a novel member of the transforming growth factor-beta superfamily, is overexpressed in preeclampsia and causes apoptosis in trophoblast cells.» *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 90, no 5, p. 3045-3053.
- Li, H.S. et Montell, C. 2000. «TRP and the PDZ protein, Inad, form the core complex required for retention of the signalplex in drosophila photoreceptor cells.» *J Cell Biol*, vol. 150, no 6, p. 1411-1422.
- Li, H.Y., Chang, S.P., Yuan, C.C., Chao, H.T., Ng, H.T., Sung, Y.J. 2001. «Nitric oxide induces extensive apoptosis in endometrial epithelial cells in the presence of progesterone: involvement of mitogen-activated protein kinase pathways.» *Mol Hum Reprod*, vol. 7, no 8, p. 755-763.
- Liao, Q., Yang, W., Jia, Y., Chen, X., Gao, Q., Bi, K. 2005. «LC-MS determination and pharmacokinetic studies of ursolic acid in rat plasma after administration of the traditional chinese medicinal preparation Lu-Ying extract.» *Yakugaku Zasshi*, vol. 125, no 6, p. 509-515.
- Lin, F.J., Fitzpatrick, J.W., Iannotti, C.A., Martin, D.S., Mariani, B.D., Tuan, R.S. 1997. «Effects of cadmium on trophoblast calcium transport.» *Placenta*, vol. 18, no 4, p. 341-356.
- Linck, B., Qiu, Z., He, Z., Tong, Q., Hilgemann, D.W., Philipson, K.D. 1998. «Functional comparison of the three isoforms of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX1, NCX2, NCX3).» *Am J Physiol*, vol. 274, 2Pt1, C415-423.

- Lindahl, O. et Lindwall, La. 1989. «Double blind study of a Valerian preparation.» *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, vol. 32, no 4, p. 1065-1066.
- Liu, B., Hill, S.J. et Khan, R.N. 2005. «Oxytocin inhibits T-type calcium current of human decidual stromal cells.» *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 90, no 7, p. 4191-4197.
- Liu, C.D., Kwan, D., Saxton, R.E. et McFadden, D.W. 2000. «Hypericin and photodynamic therapy decreases human pancreatic cancer in vitro and in vivo.» *J Surg Res*, vol. 93, no 1, p. 137-143.
- Liu, F., Soares, M.J. et Audus, K.L. 1997. «Permeability properties of monolayers of the human trophoblast cell line BeWo.» *Am J Physiol*, vol. 273, 5 Pt1, C1596-1604.
- Liu, J. 1995. «Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid.» *J Ethnopharmacol*, vol. 49, no 2, p. 57-68.
- Lorenzi, H. et Matos, F.J.A. 2002. *Plantas Mediciniais No Brasil - Nativas E Exóticas*. Lorenzi, FJA. (Ed.), São Paulo: Instituto Plantarum, 544 p.
- Love, A., Naik, D., Basak, S.K., Babu, S., Pathak, N., Babu, C.R. 2009. «Variability in foliar essential oils among different morphotypes of *Lantana* species complexes, and its taxonomic and ecological significance.» *Chem Biodivers*, vol. 6, no 12, p. 2263-2274.
- Luo, W.B., Dong, L. et Wang, Y.P. 2002. «Effect of magnesium lithospermate B on calcium and nitric oxide in endothelial cells upon hypoxia/reoxygenation.» *Acta Pharmacol Sin*, vol. 23, no 10, p. 930-936.
- MacDonald, S.M., Rafnar, T., Langdon, J., Lichtenstein, L.M. 1995. «Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor.» *Science*, vol. 269, no 5224, p. 688-690.
- Mahato, S.B. et Kundu, A.P. 1994. «¹³C Nmr spectra of pentacyclic triterpenoids-a compilation and some salient features.» *Phytochemistry*, vol. 37, no 6, p. 1517-1575.
- Malassine, A. et Cronier, L. 2002. «Hormones and human trophoblast differentiation: a review.» *Endocrine*, vol. 19, no 1, p. 3-11.
- Malassine, A. 2001. «Morphological variability and placental function.» *Gynecol Obstet Fertil*, vol. 29, no 7-8, p. 489-496.
- Malassine, A., Blaise, S., Handschuh, K., Lalucque, H., Dupressoir, A., Evain-Brion, D., Heidmann, T. 2007. «Expression of the fusogenic HERV-FRD Env glycoprotein (Syncytin 2) in human placenta is restricted to villous cytotrophoblastic cells.» *Placenta*, vol. 28, no 2-3, p. 185-191.

- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. 2004. «Polyphenols: food sources and bioavailability.» *Am J Clin Nutr*, vol. 79, no 5, p. 727-747.
- Mansour, S.J., Matten, W.T., Hermann, A.S., Candia, J.M., Rong, S., Fukasawa, K., Vande Woude, G.F., Ahn, N.G. 1994. «Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase.» *Science*, vol. 265, no 5174, p. 966-970.
- Marais, R., Light, Y., Mason, C., Paterson, H., Olson, M.F., Marshall, C.J. 1998. «Requirement of Ras-GTP-Raf complexes for activation of Raf-1 by protein kinase C.» *Science*, vol. 280, no 5360, p. 109-112.
- Marcus, D.M. et Snodgrass, W.R. 2005. «Do no harm: avoidance of herbal medicines during pregnancy.» *Obstet Gynecol*, vol. 105, 5 Pt1, p. 1119-1122.

- Marin, R., Riquelme, G., Godoy, V., Diaz, P., Abad, C., Caires, R., Proverbio, T., Pinero, S., Proverbio, F. 2008. «Functional and structural demonstration of the presence of Ca-ATPase (PMCA) in both microvillous and basal plasma membranes from syncytiotrophoblast of human term placenta.» *Placenta*, vol. 29, no 8, p. 671-679.
- Markowitz, J.S. et DeVane, C.L. 2001. «The emerging recognition of herb-drug interactions with a focus on St. John's wort (*Hypericum perforatum*).» *Psychopharmacol Bull Winter*, vol. 35, no 1, p. 53-64.
- Marques, L.C. 1999. Normatização da produção e comercialização de fitoterápicos no Brasil. In: *Farmacognosia - Da Planta Ao Medicamento*, Simões, et al. (Ed.), Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFCS, p. 259-289.
- Marshall, C.J. 1995. «Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation.» *Cell*, vol. 80, no 2, p. 179-185.
- Martell, K.J., Seasholtz, A.F., Kwak, S.P., Clemens, K.K., Dixon, J.E. 1995. «HVH-5: a protein tyrosine phosphatase abundant in brain that inactivates mitogen-activated protein kinase.» *J Neurochem*, vol. 65, no 4, p. 1823-1833.
- Martínez-González, J., Rodríguez-Rodríguez, R., González-Díez, M., Rodríguez, C., Herrera, M.D., Ruiz-Gutierrez, V., Badimon, L. 2008. «Oleanolic acid induces prostacyclin release in human vascular smooth muscle cells through a cyclooxygenase-2-dependent mechanism.» *J Nutr*, vol. 138, no 3, p. 443-448.
- Matos, F. 1997. Introdução À Fitoquímica Experimental. Fortaleza: E.U.F.d. Ceará (Ed.), p. 141.
- Maulik, N., Yoshida, T., Zu, Y.L., Sato, M., Banerjee, A., Das, D.K. 1998. «Ischemic preconditioning triggers tyrosine kinase signaling: a potential role for MAPKAP kinase 2.» *Am J Physiol*, vol. 275, 5 Pt2, H1857-1864.
- McAllister, B.S., Walters, J.D., Olson, M.S. 1994. «Signal transduction mechanisms in mesenchymal cells.» *Crit Rev Oral Biol Med*, vol. 5, no 3-4, p. 291-310.
- McKay, D.L. et Blumberg, J.B. 2006. «A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.).» *Phytother Res*, vol. 20, no. 8, p. 619-33.
- McLaughlin, M.M., Kumar, S., McDonnell, P.C., Van Horn, S., Lee, J.C., Livi, G.P., Young, P.R. 1996. «Identification of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-3, a novel substrate of CSBP P38 MAP kinase.» *J Biol Chem*, vol. 271, no 14, p. 8488-8492.

- McRobie, D.J., Glover, D.D., Tracy, T.S. 1998. «Effects of gestational and overt Diabetes on human placental cytochromes P450 and glutathione S-transferase.» *Drug Metab Dispos*, vol. 26, no 4, p. 367-371.
- Mei, N., Guo, L., Fu, P.P., Heflich, R.H., Chen, T. 2005. «Mutagenicity of comfrey (*Symphytum Officinale*) in rat liver.» *Br J Cancer*, vol. 92, no 5, p. 873-5.
- Meissner, U., Spranger, R., Lehner, M., Allabauer, I., Rascher, W., Dotsch, J. 2005. «Hypoxia-induced leptin production in human trophoblasts does not protect from apoptosis.» *Eur J Endocrinol*, vol. 153, no 3, p. 455-461.
- Meldolesi, J. et Pozzan, T. 1998. «The endoplasmic reticulum Ca^{2+} store: a view from the lumen.» *Trends Biochem Sci*, vol. 23, no 1, p. 10-14.
- Mello, F.B., Jacobus, D., Carvalho, K., Mello, J.R. 2005. «Effects of *Lantana camara* (Verbenaceae) on general reproductive performance and teratology in rats.» *Toxicol*, vol. 45, no 4, p. 459-466.
- Metzger, H. et Lindner, E. 1981. «The positive inotropic-acting forskolin, a potent adenylate cyclase activator.» *Arzneimittelforschung*, vol. 31, no 8, p. 1248-1250.
- Meuris, S., Polliotti, B., Robyn, C., Lebrun, P. 1994. « Ca^{2+} entry through L-type voltage-sensitive Ca^{2+} channels stimulates the release of human chorionic gonadotrophin and placental lactogen by placental explants.» *Biochim Biophys Acta*, vol. 1220, no 2, p. 101-106.
- Michel, J.J. et Scott, J.D. 2002. «AKAP mediated signal transduction.» *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, vol. 42, p. 235-257.
- Middleton, E., Jr., Kandaswami, C. et Theoharides, T.C. 2000. «The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer.» *Pharmacol Rev*, vol. 52, no 4, p. 673-751.
- Midgley, A.R., Pierce, G.B., Jr., Deneau, G.A. et Gosling, J.R. 1963. «Morphogenesis of syncytiotrophoblast in vivo: an autoradiographic demonstration.» *Science*, vol. 141, 349-350.
- Miller A.L. 1998. «St. John's Wort (*Hypericum perforatum*): clinical effects on depression and other conditions.» *Altern Med Rev*, vol. 3, p. 18-26.
- Miskovsky, P., Sureau, F., Chinsky, L., Turpin, P.Y. 1995. «Subcellular distribution of hypericin in human cancer cells.» *Photochem Photobiol*, vol. 62, no 3, p. 546-549.
- Misra-Press, A., Rim, C.S., Yao, H., Roberson, M.S., Stork, P.J. 1995. A Novel Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase. «Structure, expression, and regulation.» *J Biol Chem*, vol. 270, no 24, p. 14587-14596.

- Mix, J.A. et Crews, W.D. 2000. «An examination of the efficacy of Ginkgo biloba extract EGb761 on the neuropsychologic functioning of cognitively intact older adults.» *J Altern Complement Med*, vol. 6, no 3, p. 219-229.
- Mody, A., Weiner, J. et Ramanathan, S. 2009. «Modularity of MAP kinases allows deformation of their signalling pathways.» *Nat Cell Biol*, vol. 11, no 4, p. 484-4.
- Montalban, A.G., Boman, E., Chang, C.D., Ceide, S.C., Dahl, R., Dalesandro, D., Delaet, N.G., Erb, E., Ernst, J., Gibbs, A., Kahl, J., Kessler, L., Lundström, J., Miller, S., Nakanishi, H., Roberts, E., Saiah, E., Sullivan, R., Wang, Z., Larson, C.J. 2010. «Kr-003048, a potent, orally active inhibitor of P38 mitogen-activated protein kinase.» *Eur J Pharmacol*, vol. 632, no 1-3, p. 93-102.
- Montell, C. 2001. «Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels.» *Sci STKE*, vol. 90, re 1.
- Moon, D.O., Lee, K.J., Choi, Y.H., Kim, G.Y. 2007. «Beta-sitosterol-induced-apoptosis is mediated by the activation of ERK and the downregulation of Akt in MCA-102 murine fibrosarcoma cells.» *Int Immunopharmacol*, vol. 7, no 8, p. 1044-1053.
- Moon, K.C., Park, J.S., Norwitz, E.R., Kim, D.I., Oh, K.J., Park, C.W., Jun, J.K., Syn, H.C. 2008. «Expression of extracellular signal-regulated kinase1/2 and P38 mitogen-activated protein kinase in the invasive trophoblasts at the human placental bed.» *Placenta*, vol. 29, no 5, p. 391-395.
- Mordret, G. 1993. «MAP kinase kinase: a node connecting multiple pathways.» *Biol Cell*, vol. 79, no 3, p. 193-207.
- Moreau, R., Daoud, G., Bernatchez, R., Simoneau, L., Masse, A., Lafond, J. 2002a. «Calcium uptake and calcium transporter expression by trophoblast cells from human term placenta.» *Biochim Biophys Acta*, vol. 1564, no 2, p. 325-332.
- Moreau, R., Hamel, A., Daoud, G., Simoneau, L., Lafond, J. 2002b. «Expression of calcium channels along the differentiation of cultured trophoblast cells from human term placenta.» *Biol Reprod*, vol. 67, no 5, p. 1473-1479.
- Moreau, R., Simoneau, L., Lafond, J. 2001. «Characteristics of calcium uptake by BeWo cells, a human trophoblast cell line.» *Placenta*, vol. 22, no 8-9, p. 768-775.
- Moreira, R.C.T., Costa, L.C.B., Costa, R.C.S., Rocha, E.A. 2002. «Abordagem etnobotânica acerca do uso de plantas medicinais na vila Cachoeira, Ilhéus, Bahia, Brasil.» *Acta Farm Bonaerense*, vol. 21, no 3, p. 1-7.
- Moriguchi, T., Kuroyanagi, N., Yamaguchi, K., Gotoh, Y., Irie, K., Kano, T., Shirakabe, K., Muro, Y., Shibuya, H., Matsumoto, K., Nishida, E., Hagiwara, M. 1996. «A novel kinase

- cascade mediated by mitogen-activated protein kinase kinase 6 and MKK3.» *J Biol Chem*, vol. 271, no 23, p. 13675-13679.
- Morooka, T. et Nishida, E. 1998. «Requirement of P38 mitogen-activated protein kinase for neuronal differentiation in PC12 cells.» *J Biol Chem*, vol. 273, no 38, p. 24285-24288.
- Morrish, D.W., Bhardwaj, D., Dabbagh, L.K., Marusyk, H., Siy, O. 1987. «Epidermal growth factor induces differentiation and secretion of human chorionic gonadotropin and placental lactogen in normal placenta.» *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 65, p. 1282-1290.
- Morrish, D.W., Dakour, J., Li, H. 1998. «Functional regulation of human trophoblast differentiation.» *J Reprod Immunol*, vol. 39, no 1-2, p. 179-195.
- Morrish, D.W., Dakour, J., Li, H. 2001. «Life and death in the placenta: new peptides and genes regulating human syncytiotrophoblast and extravillous cytotrophoblast lineage formation and renewal.» *Curr Protein Pept Sci*, vol. 2, no 3, p. 245-259.
- Mors, W.B., Rizzini, C.T. et Pereira, N.A. 2000. *Medicinal Plants of Brazil*. Michigan: Algonac. 501 p.
- Moussally, K., Oraichi, D. et Berard, A. 2009. «Herbal products use during pregnancy: prevalence and predictors.» *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, vol. 18, no 6, p. 454-461.
- Moyer, J.D., Barbacci, E.G., Iwata, K.K., Arnold, L., Boman, B., Cunningham, A., DiOrio, C., Doty, J., Morin, M.J., Moyer, M.P., Neveu, M., Pollack, V.A., Pustilnik, L.R., Reynolds, M.M., Sloan, D., Theleman, A., Miller, P. 1997. «Induction of apoptosis and cell cycle arrest by CP-358,774, an inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase.» *Cancer Res*, vol. 57, no 21, p. 4838-4848.
- Muda, M., Theodosiou, A., Rodrigues, N., Boschert, U., Camps, M., Gillieron, C., Davies, K., Ashworth, A., Arkininstall, S. 1996. «The dual specificity phosphatases M3/6 and MKP-3 are highly selective for inactivation of distinct mitogen-activated protein kinases.» *J Biol Chem*, vol. 271, no 44, p. 27205-27208.
- Muller, D., Hoenderop, J.G., Meij, I.C., van den Heuvel, L.P., Knoers, N.V., den Hollander, A.I., Eggert, P., Garcia-Nieto, V., Claverie-Martin, F., Bindels, R.J. 2000a. «Molecular cloning, tissue distribution, and chromosomal mapping of the human epithelial Ca²⁺ channel (Ecacl1).» *Genomics*, vol. 67, no 1, p. 48-53.
- Muller, D., Hoenderop, J.G., Merckx, G.F., van Os, C.H., Bindels, R.J. 2000b. «Gene structure and chromosomal mapping of human epithelial calcium channel.» *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 275, no 1, p. 47-52.
- Muller, W.E., Singer, A., Wonnemann, M. 2001. «Hyperforin-antidepressant activity by a novel mechanism of action.» *Pharmacopsychiatry*, vol. 34, Suppl 1, S98-102.

- Munir, A.A. 1996. «A taxonomic review of *Lantana camara* and *L. Montevidensis* (Spreng.) Briq. (Verbenaceae) in Australia.» *J Adelaide Bot Gard*, vol. 17, p. 1-27.
- Muniyappa, H. et Das, K.C. 2008. «Activation of C-Jun N-terminal kinase (JNK) by widely used specific P38 MAPK inhibitors SB202190 and SB203580: A MLK-3-MKK7-dependent mechanism.» *Cell Signal*, vol. 20, no 4, p. 675-683.
- Murata, T., Shimizu, K., Hiramoto, K., Tagawa, T. 2009. «Phosphodiesterase 3 (PDE3): structure, localization and function.» *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*, vol. 7, no 3, p. 206-211.
- Myllynen, P., Pasanen, M. et Pelkonen, O. 2005a. «Human placenta: a human organ for developmental toxicology research and biomonitoring.» *Placenta*, vol. 26, no 5, p. 361-371.
- Myllynen, P., Pienimäki, P. et Vahakangas, K. 2005b. «Human placental perfusion method in the assessment of transplacental passage of antiepileptic drugs.» *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 207, Supl 2, p. 489-494.
- Nagata, K., Puls, A., Futter, C., Aspenstrom, P., Schaefer, E., Nakata, T., Hirokawa, N., Hall, A. 1998. «The MAP kinase kinase kinase MLK2 co-localizes with activated JNK along microtubules and associates with kinesin superfamily motor Kif3.» *Embo J*, vol. 17, no 1, p. 149-158.
- Nakayama, S. et Kretsinger, R.H. 1994. «Evolution of the EF-hand family of proteins.» *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, vol. 23, p. 473-507.
- New, L., Jiang, Y., Zhao, M., Liu, K., Zhu, W., Flood, L.J., Kato, Y., Parry, G.C., Han, J. 1998. «PRAK, a novel protein kinase regulated by the P38 MAP kinase.» *Embo J*, vol. 17, no 12, p. 3372-3384.
- Nick, J.A., Avdi, N.J., Young, S.K., Lehman, L.A., McDonald, P.P., Frasch, S.C., Billstrom, M.A., Henson, P.M., Johnson, G.L., Worthen, G.S. 1999. «Selective activation and functional significance of P38alpha mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-stimulated neutrophils.» *J Clin Invest*, vol. 103, no 6, p. 851-858.
- Niemeyer, B.A., Bergs, C., Wissenbach, U., Flockerzi, V., Trost, C. 2001. «Competitive regulation of Cat-like-mediated Ca²⁺ entry by protein kinase C and Calmodulin.» *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 98, no 6, p. 3600-3605.
- Nikitenko, L., Morgan, G., Kolesnikov, S.I., Wooding, F.B. 1998. «Immunocytochemical and in situ hybridization studies of the distribution of Calbindin D9k in the bovine placenta throughout pregnancy.» *J Histochem Cytochem*, vol. 46, no 5, p. 679-688.

- Nilius, B., Prenen, J., Vennekens, R., Hoenderop, J.G., Bindels, R.J., Droogmans, G. 2001a. «Modulation of the epithelial calcium channel, Ecac, by intracellular Ca^{2+} .» *Cell Calcium*, vol. 29, no 6, p. 417-428.
- Nilius, B., Vennekens, R., Prenen, J., Hoenderop, J.G., Droogmans, G., Bindels, R.J. 2001b. «The single pore residue Asp542 determines Ca^{2+} permeation and Mg^{2+} block of the epithelial Ca^{2+} channel.» *J Biol Chem*, vol. 276, no 2, p. 1020-1025.
- Novak, D., Quiggle, F. et Haafiz, A. 2006. «Impact of forskolin and amino acid depletion upon system a activity and Snat expression in BeWo cells.» *Biochimie*, vol. 88, no 1, p. 39-44.
- Ohren, J.F., Chen, H., Pavlovsky, A., Whitehead, C., Zhang, E., Kuffa, P., Yan, C., McConnell, P., Spessard, C., Banotai, C., Mueller, W.T., Delaney, A., Omer, C., Sebolt-Leopold, J., Dudley, D.T., Leung, I.K., Flamme, C., Warmus, J., Kaufman, M., Barrett, S., Tecle, H., Hasemann, C.A. 2004. «Structures of human MAP kinase kinase 1 (MEK1) and MEK2 describe novel noncompetitive kinase inhibition.» *Nat Struct Mol Biol*, vol. 11, no 12, p. 1192-1197.
- Oliveira, M.J.R., Simões, M.J.S., Sassi, C.R.R. 2006. «Fitoterapia no sistema de saúde pública (SUS) no Estado de São Paulo, Brasil/Phytotherapy in the public health system (Sus) in the Sao Paulo state, Brazil.» *Rev. Bras. Pl. Med.*, vol. 8, no 2, p. 39-41.
- Ono, K. et Han, J. 2000. «The P38 signal transduction pathway: activation and function.» *Cell Signal*, vol. 12, no 1, p. 1-13.
- Ono, M., Ishimatsu, N., Masuoka, C., Yoshimitsu, H., Tsuchihashi, R., Okawa, M., Kinjo, J., Ikeda, T., Nohara, T. 2007. «Three new monoterpenoids from the fruit of *Genipa americana*.» *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, vol. 55, no 4, p. 632-634.
- Ono, M., Ueno, M., Masuoka, C., Ikeda, T., Nohara, T. 2005. «Iridoid glucosides from the fruit of *Genipa americana*.» *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, vol. 53, no 10, p. 1342-1344.
- Owens, D.M. et Keyse, S.M. 2007. «Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases.» *Oncogene*, vol. 26, no 22, p. 3203-3213.
- Oztürk, N., Korkmaz, S., Oztürk, Y. 2007. Wound-healing activity of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) on chicken embryonic fibroblasts. *J Ethnopharmacol*, vol.111, no 1, p. 33-9.
- Pahl, H.L. et Baeuerle, P.A. 1997. «Endoplasmicreticulum-induced signal transduction and gene expression.» *Trends Cell Biol*, vol. 7, no 2, p. 50-55.
- Pan, C.Y., Kao, Y.H. et Fox, A.P. 2002. «Enhancement of inward Ca^{2+} currents in bovine chromaffin cells by green tea polyphenol extracts.» *Neurochem Int*, vol. 40, no 2, p. 131-7.

- Pan, W.D., Li, Y.J., Mai, L.T., Ohtani, K., Kasai, R., Tanaka, O. 1992. «Studies on chemical constituents of the roots of *Lantana camara*.» *Yao Xue Xue Bao*, vol. 27, no 7, p. 515-521.
- Pang, L., Sawada, T., Decker, S.J., Saltiel, A.R. 1995. «Inhibition of MAP kinase kinase blocks the differentiation of PC-12 cells induced by nerve growth factor.» *J Biol Chem*, vol. 270, no 23, p. 13585-13588.
- Parekh, A.B. et Putney, J.W., Jr. 2005. «Store-operated calcium channels.» *Physiol Rev*, vol. 85, no 2, p. 757-810.
- Park, T.J. et Kim, K.T. 1996. «Cyclic AMP-independent inhibition of voltage-sensitive calcium channels by forskolin in PC12 cells.» *J Neurochem*, vol. 66, no 1, p. 83-88.
- Parmentier, M., Lawson, D.E. et Vassart, G. 1987. «Human 27-Kda calbindin complementary DNA sequence. Evolutionary and functional implications.» *Eur J Biochem*, vol. 170, no 1-2, p. 207-215.
- Patel, T.B., Du, Z., Pierre, S., Cartin, L., Scholich, K. 2001. «Molecular biological approaches to unravel Adenylyl cyclase signaling and function.» *Gene*, vol. 269, no 1-2, p. 13-25.
- Pathak, A.K., Bhutani, M., Nair, A.S., Ahn, K.S., Chakraborty, A., Kadara, H., Guha, S., Sethi, G., Aggarwal, B.B. 2007. «Ursolic acid inhibits STAT3 activation pathway leading to suppression of proliferation and chemosensitization of human multiple myeloma cells.» *Mol Cancer Res*, vol. 5, no 9, p. 943-955.
- Pattillo, R.A. et Gey, G.O. 1968. «The establishment of a cell line of human hormone-synthesizing trophoblastic cells in vitro.» *Cancer Res*, vol. 28, no 7, p. 1231-1236.
- Pattillo, R.A., Gey, G.O., Delfs, E., Mattingly, R.F. 1968a. «Human hormone production in vitro.» *Science*, vol. 159, no 3822, p. 1467-1469.
- Pattillo, R.A., Gey, G.O., Delfs, E., Mattingly, R.F. 1968b. «In vitro identification of the trophoblastic stem cell of the human villous placenta.» *Am J Obstet Gynecol*, vol. 100, no 4, p. 582-588.
- Pattillo, R.A., Hussa, R.O., Huang, W.Y., Delfs, E., Mattingly, R.F. 1972. «Estrogen production by trophoblastic tumors in tissue culture.» *J Clin Endocrinol*, vol. 34, p. 59-61.
- Pattillo, R.A., Hussa, R.O., Ruckert, A.C., Kurtz, J.W., Cade, J.M., Rinke, M.L. 1979. «Human chorionic gonadotropin in BeWo trophoblastic cells after 12 years in continuous culture: retention of intact human chorionic gonadotropin secretion in mechanically versus enzyme-dispersed cells.» *Endocrinology*, vol. 105, no 4, p. 967-974.

- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., Cobb, M.H. 2001. «Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions.» *Endocr Rev*, vol. 22, no 2, p. 153-183.
- Peeyush, L., Khoo, N. et Guimond, M.-J., Chakraborty, C. 1999. «Control mechanisms in human trophoblast proliferation and invasiveness: their derangement during trophoblastic tumor progression - a review.» *Trophoblast Research*, vol. 13, p. 119-136.
- Peng, J.B., Brown, E.M. et Hediger, M.A. 2001. «Structural conservation of the genes encoding Cat1, Cat2, and related cation channels.» *Genomics*, vol. 76, no 1-3, p. 99-109.
- Peng, J.B., Chen, X.Z., Berger, U.V., Weremowicz, S., Morton, C.C., Vassilev, P.M., Brown, E.M., Hediger, M.A. 2000. «Human calcium transport protein Cat1.» *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 278, no 2, p. 326-332.
- Perez, A.V., Picotto, G., Carpentieri, A.R., Rivoira, M.A., Peralta Lopez, M.E., Tolosa de Talamoni, N.G. 2008. «Minireview on regulation of intestinal calcium absorption. Emphasis on molecular mechanisms of transcellular pathway.» *Digestion*, vol. 77, no 1, p. 22-34.
- Perloff, M.D., von Moltke, L.L., Störmer, E., Shader, R.I., Greenblatt, D.J. 2001. «Saint John's wort: an in vitro analysis of P-glycoprotein induction due to extended exposure.» *Br J Pharmacol*, vol., 134, p. 1601-1608.
- Pessin, J.E., Gitomer, W., Oka, Y., Oppenheimer, C.L., Czech, M.P. 1983. «Beta-adrenergic regulation of insulin and epidermal growth factor receptors in rat adipocytes.» *J Biol Chem*, vol. 258, no 12, p. 7386-7394.
- Pidoux, G., Gerbaud, P., Marpeau, O., Guibourdenche, J., Ferreira, F., Badet, J., Evain-Brion, D., Frendo, J.L. 2007. «Human placental development is impaired by abnormal human chorionic gonadotropin signaling in Trisomy 21 pregnancies.» *Endocrinology*, vol. 148, no 11, p. 5403-5413.
- Pinto, E.P.P., Amorozo, M. C. M. et Furlan, A. 2006. «Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de Mata Atlântica - Itacaré, Ba, Brasil.» *Acta Bo. Bras*, vol. 20, no 4, p. 751-762.
- Plessow, D., Waldschlager, J., Richter, D.U., Jeschke, U., Bruer, G., Briese, V., Friese, K. 2003. «Effects of phytoestrogens on the trophoblast tumour cell lines BeWwo and Jeg3.» *Anticancer Res*, vol. 23, no 2A, p. 1081-1086.
- Pospechova, K., Rozehnal, V., Stejskalova, L., Vrzal, R., Pospisilova, N., Jamborova, G., May, K., Siegmund, W., Dvorak, Z., Nachtigal, P., Semecky, V., Pavek, P. 2009. «Expression and activity of vitamin D receptor in the human placenta and in choriocarcinoma BeWo and Jeg-3 cell lines.» *Mol Cell Endocrinol*, vol. 299, no 2, p. 178-187.

Premont, R.T., Matsuoka, I., Mattei, M.G., Pouille, Y., Defer, N., Hanoune, J. 1996. «Identification and characterization of a widely expressed form of Adenylyl Cyclase.» *J Biol Chem*, vol. 271, no 23, p. 13900-13907.

- Prouillac, C., Videmann, B., Mazallon, M., Lecoeur, S. 2009. «Induction of cells differentiation and Abc transporters expression by a myco-estrogen, zearalenone, in human choriocarcinoma cell line (Bewo).» *Toxicology*, vol. 263, no 2-3, p. 100-107.
- Putney, J.W., Jr. 1986. «A model for receptor-regulated calcium entry.» *Cell Calcium*, vol. 7, no 1, p. 1-12.
- Putney, J.W., Jr. 1990. «Capacitative calcium entry revisited.» *Cell Calcium*, vol. 11, no 10, p. 611-624.
- Pyne, N.J. et Pyne, S. 1997. «Platelet-derived growth factor activates a mammalian STE20 coupled mitogen-activated protein kinase in airway smooth muscle.» *Cell Signal*, vol. 9, no 3-4, p. 311-317.
- Rates, S.M. 2001. «Plants as source of drugs.» *Toxicon*, vol. 39, no 5, p. 603-613.
- Rebut-Bonneton, C., Boutemy-Roulier, S., Evain-Brion, D. 1993. «Modulation of Pp60c-Src activity and cellular localization during differentiation of human trophoblast cells in culture.» *J Cell Sci*, vol. 105, Pt 3, p. 629-636.
- Refuerzo, J.S., Blackwell, S.C., Sokol, R.J., Lajeunesse, L., Firchau, K., Kruger, M., Sorokin, Y. 2005. «Use of over-the-counter medications and herbal remedies in pregnancy.» *Am J Perinatol*, vol. 22, no 6, p. 321-324.
- Reyes-Chilpa, R., Rivera, J., Oropeza, M., Mendoza, P., Amekraz, B., Jankowski, C., Campos, M. 2004. «Methanol extracts of *Hamelia patens* containing oxindole alkaloids relax KCl-induced contraction in rat myometrium.» *Biol Pharm Bull*, vol. 27, no 10, p. 1617-1620.
- Ricquart, M. Produits de santé naturels et médicaments : un mélange parfois risqué. Edité par : Option consommateurs. 2010.
- Riedel, K.D., Rieger, K., Martin-Facklam, M., Mikus, G., Haefeli, W.E., Burhenne, J. 2004. «Simultaneous determination of hypericin and hyperforin in human plasma with liquid chromatography-tandem mass spectrometry.» *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, vol. 813, no 1-2, p. 27-33.
- Rinnerthaler, M., Jarolim, S., Heeren, G., Palle, E., Perju, S., Klinger, H., Bogengruber, E., Madeo, F., Braun, R.J., Breitenbach-Koller, L., Breitenbach, M., Laun, P. 2006. «Mmi1 (Ykl056c, Tma19), the yeast orthologue of the translationally controlled tumor protein (Tctp) Has apoptotic functions and interacts with both microtubules and mitochondria.» *Biochim Biophys Acta*, vol. 1757, no 5-6, p. 631-638.

- Robidoux, J., Simoneau, L., Masse, A., Lafond, J. 2000. «Activation of L-type calcium channels induces corticotropin-releasing factor secretion from human placental trophoblasts.» *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 85, no 9, p. 3356-3364.
- Robineau, L. 1995. Hacia Una Pharmacopea Caribeña. In: *TRAMIL 7*, Robineau (Ed.), Santo Domingo (Republica Dominicana): Enda-Caribe Universidad Nacional Autónoma de Honduras y Universidade de Antioquia, editorial Santo Domingo, p. 696.
- Rossant, J. et Cross, J.C. 2001. «Placental development: lessons from mouse mutants.» *Nat Rev Genet*, vol. 2, no 7, p. 538-548.
- Rote, N.S., Chakrabarti, S., Stetzer, B.P. 2004. «The role of human endogenous retroviruses in trophoblast differentiation and placental development.» *Placenta*, vol. 25, no 8-9, p. 673-683.
- Roth, S., Shaikh, A.R., Hennelly, M.M., Li, Q., Bindokas, V., Graham, C.E. 2003. «Mitogen-activated protein kinases and retinal ischemia.» *Invest Ophthalmol Vis Sci*, vol. 44, no 12, p. 5383-5395.
- Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T., Nebreda, A.R., 1994. «A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins.» *Cell*, vol. 78, no 6, p. 1027-1037.
- Rousseau, S., Houle, F., Landry, J., Huot, J., 1997. «P38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells.» *Oncogene*, vol. 15, no 18, p. 2169-2177.
- Rousseaux, C.G. et Schachter, H. 2003. «Regulatory issues concerning the safety, efficacy and quality of herbal remedies.» *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, vol. 68, no 6, p. 505-510.
- Roux, P.P. et Blenis, J. 2004. «Erk and P38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions.» *Microbiol Mol Biol Rev*, vol. 68, no 2, p. 320-344.
- Roz, N. et Rehavi, M. 2003. «Hyperforin inhibits vesicular uptake of monoamines by dissipating pH gradient across synaptic vesicle membrane.» *Life Sci*, vol. 73, no 4, p. 461-70.
- Rubinfield, R. 2004. «The ERK cascade as a prototype of MAPK signaling pathways. In: *MAP kinase signaling protocols*, Totowa, NJ: H.P. Inc. (Ed.), p. 1-49.
- Sabo, A., Stanulovic, M., Jakovljevic, V., Grujic, Z. 2001. «Collaborative study on drug use in pregnancy: the results of the follow-up 10 years after (Novi Sad Centre).» *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, vol. 10, no 3, p. 229-235.

- Sacchettini, J.C. et Poulter, C.D. 1997. «Creating isoprenoid diversity.» *Science*, vol. 277, no 5333, p. 1788-1789.
- Sahu, A., Rawal, N., Pangburn, M.K. 1999. «Inhibition of complement by covalent attachment of rosmarinic acid to activated C3b.» *Biochem Pharmacol*, vol. 57, no 12, p. 1439-46.
- Saintonge, J. et Rosso, P. 1983. «Placental blood flow and transfer of nutrient analogues during normal gestation in the guinea pig.» *Placenta*, vol. 4, no 1, p. 31-39.
- Salmeron, A., Ahmad, T.B., Carlile, G.W., Pappin, D., Narsimhan, R.P., Ley, S.C. 1996. «Activation of MEK-1 and SEK-1 by Tpl-2 proto-oncoprotein, a novel MAP kinase kinase.» *Embo J*, vol. 15, no 4, p. 817-826.
- Sanchez, C., Diaz-Nido, J. et Avila, J. 2000. «Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function.» *Prog Neurobiol*, vol. 61, no 2, p. 133-168.
- Sanchez, J.C., Schaller, D., Ravier, F., Golaz, O., Jaccoud, S., Belet, M., Wilkins, M.R., James, R., Deshusses, J., Hochstrasser, D. 1997. «Translationally controlled tumor protein: a protein identified in several nontumoral cells including erythrocytes.» *Electrophoresis*, vol. 18, no 1, p. 150-155.
- Sanchez-Reus, M.I., Gomez del Rio, M.A., Iglesias, I., Elorza, M., Slowing, K., Benedi, J. 2007. «Standardized *Hypericum perforatum* reduces oxidative stress and increases gene expression of antioxidant enzymes on rotenone-exposed rats.» *Neuropharmacology*, vol. 52, no 2, p. 606-616.
- Santos, R.I. 1999. Metabolismo Básico E Origem Dos Metabólitos Secundários. In: *Farmacognosia - Da Planta Ao Medicamento*, Simões et al. (Ed.). Porto Alegre/Florianópolis: Ed. da UFRGS/Ed. UFCS, p. 323-354.
- Sastry, B.V. 1999. «Techniques to study human placental transport.» *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 38, no 1, p. 17-39.
- Schempp, C.M., Ludtke, R., Winghofer, B., Simon, J.C. 2000. «Effect of topical application of *Hypericum perforatum* extract (St. John's Wort) on skin sensitivity to solar simulated radiation.» *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, vol. 16, no 3, p. 125-128.
- Schmitt, A.C., Ravazzolo, A.P., von Poser, G.L. 2001. «Investigation of some *Hypericum* species native to southern of Brazil for antiviral activity.» *J Ethnopharmacol*, vol. 77, no 2-3, p. 239-245.
- Schoeber, J.P., Hoenderop, J.G., Bindels, R.J. 2007. «Concerted action of associated proteins in the regulation of TRPV5 and TRPV6.» *Biochem Soc Trans*, vol. 35, Pt1, p. 115-119.

- Schwartzberg, P.L. 1998. «The many faces of Src: multiple functions of a prototypical tyrosine kinase.» *Oncogene*, vol. 17, 11 reviews, p. 1463-1468.
- Schwarz, A., Felipe, E.C., Bernardi, M.M., Spinosa, H.S. 2005. «Impaired female sexual behavior of rat offspring exposed to *Solanum lycocarpum* unripe fruits during gestation and lactation: lack of hormonal and fertility alterations.» *Pharmacol Biochem Behav*, vol. 81, no 4, p. 928-934.
- Scifres, C.M. et Nelson, D.M. 2009. «Intrauterine growth restriction, human placental development and trophoblast cell death.» *J Physiol*, vol. 587, Pt14, p. 3453-3458.
- Scott, P.H., Paul, A., Belham, C.M., Peacock, A.J., Wadsworth, R.M., Gould, G.W., Welsh, D., Plevin, R. 1998. «Hypoxic stimulation of the stress-activated protein kinases in pulmonary artery fibroblasts.» *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 158, no 3, p. 958-962.
- Seeger, R. et Krebs, E.G. 1995. «The MAPK signaling cascade.» *Faseb J*, vol. 9, no 9, p. 726-735.
- Seigler, D.S. 2002. *Plant Secondary Metabolism*. Kluwer Academic Publisher, Norwell, Massachusetts, 2nd ed., 776 p.
- Seino, S. et Shibasaki, T. 2005. «PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis.» *Physiol Rev*, vol. 85, no 4, p. 1303-1342.
- Shah, A.K., Avery, B.A. et Wyandt, C.M. 2005. «Content analysis and stability evaluation of selected commercial preparations of St. John's Wort.» *Drug Dev Ind Pharmacol*, vol. 31, p. 907-916.
- Shah, B.H., Safdar, B., Virani, S.S., Nawaz, Z., Saeed, S.A., Gilani, A.H. 1997. «The antiplatelet aggregatory activity of *Acacia nilotica* is due to blockade of calcium influx through membrane calcium channels.» *Gen Pharmacol*, vol. 29, no 2, p. 251-5.
- Shalom-Barak, T., Quach, J. et Lotz, M. 1998. «Interleukin-17-induced gene expression in articular chondrocytes is associated with activation of mitogen-activated protein kinases and NF-KappaB.» *J Biol Chem*, vol. 273, no 42, p. 27467-27473.
- Shan, J.Z., Xuan, Y.Y., Zheng, S., Dong, Q., Zhang, S.Z. 2009. «Ursolic acid inhibits proliferation and induces apoptosis of HT-29 colon cancer cells by inhibiting the EGFR/MAPK pathway.» *J Zhejiang Univ Sci B*, vol. 10, no 9, p. 668-674.
- Shapiro, L., Puren, A.J., Barton, H.A., Novick, D., Peskind, R.L., Shenkar, R., Gu, Y., Su, M.S., Dinarello, C.A. 1998. «Interleukin 18 stimulates HIV type 1 in monocytic cells.» *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 95, no 21, p. 12550-12555.

- Sharma, G.D., He, J., Bazan, H.E. 2003. «P38 and ERK1/2 coordinate cellular migration and proliferation in epithelial wound healing: evidence of cross-talk activation between MAP kinase cascades.» *J Biol Chem*, vol. 278, no 24, p. 21989-21997.
- Sharma, M., Sharma, P.D. et Bansal, M.P. 2008. «Lantadenes and their esters as potential antitumor agents.» *J Nat Prod*, vol. 71, no 7, p. 1222-1227.
- Sharma, O.P., Dawra, R.K., Krishna, L., Makkar, H.P. 1988a. «Toxicity of Lantana (*Lantana camara* L) leaves and isolated toxins to rabbits.» *Vet Hum Toxicol*, vol. 30, no 3, p. 214-218.
- Sharma, O.P., Makkar, H.P. et Dawra, R.K. 1983. «Spectrophotometric determination of lantadene a, 22 beta-angeloyloxy-3-oxoolean-12-en-28-oic acid.» *Anal Biochem*, vol. 128, no 2, p. 474-477.
- Sharma, O.P., Makkar, H.P. et Dawra, R.K. 1988b. «A review of the noxious plant *Lantana camara*.» *Toxicol*, vol. 26, no 11, p. 975-987.
- Sharma, O.P., Makkar, H.P., Dawra, R.K., Negi, S.S. 1981a. «A review of the toxicity of *Lantana camara* (Linn) in animals.» *Clin Toxicol*, vol. 18, no 9, p. 1077-1094.
- Sharma, O.P., Makkar, H.P., Dawra, R.K., Negi, S.S. 1981b. «Hepatic and renal toxicity of *Lantana* in the guinea pig.» *Toxicol Lett*, vol. 7, no 4-5, p. 347-351.
- Sharp, L.L., Schwarz, D.A., Bott, C.M., Marshall, C.J., Hedrick, S.M. 1997. «The influence of the MAPK pathway on T cell lineage commitment.» *Immunity*, vol. 7, no 5, p. 609-618.
- Shawver, L.K., Schwartz, D.P., Mann, E., Chen, H., Tsai, J., Chu, L., Taylorson, L., Longhi, M., Meredith, S., Germain, L., Jacobs, J.S., Tang, C., Ullrich, A., Berens, M.E., Hersh, E., McMahon, G., Hirth, K.P., Powell, T.J. 1997. «Inhibition of platelet-derived growth factor-mediated signal transduction and tumor growth by N-[4-(trifluoromethyl)-phenyl]5-methylisoxazole-4-carboxamide.» *Clin Cancer Res*, vol. 3, no 7, p. 1167-1177.
- Shi, Y.L. et Li, M.F. 2007. «Biological effects of toosendanin, a triterpenoid extracted from chinese traditional medicine.» *Prog Neurobiol*, vol. 82, no 1, p. 1-10.
- Shiokawa, S., Yoshimura, Y., Nagamatsu, S., Sawa, H., Hanashi, H., Sakai, K., Noguchi, K., Nakamura, Y. 1998. «Functional role of focal adhesion kinase in the process of implantation.» *Mol Hum Reprod*, vol. 4, no 9, p. 907-914.
- Shiozaki, K. et Russell, P. 1995. «Cell-cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast.» *Nature*, vol. 378, no 6558, p. 739-743.

- Shishodia, S., Majumdar, S., Banerjee, S., Aggarwal, B.B. 2003. «Ursolic acid inhibits nuclear factor-kappaB activation induced by carcinogenic agents through suppression of IkappaBalpha kinase and P65 phosphorylation: correlation with down-regulation of cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 9, and cyclin D1.» *Cancer Res*, vol. 63, no 15, p. 4375-4383.
- Siddiqui, B.S., Begum, S., Siddiqui, S., Lichter, W. 1995. «Two cytotoxic pentacyclic triterpenoids from *Nerium oleander*.» *Phytochemistry*, vol. 39, no 1, p. 171-174.
- Silva, A.J.R. et Andrade, L.H.C. 2006. «Cultural significance of plants in communities located in the coastal forest zone of the state of Pernambuco, Brazil.» *Human Ecology*, vol. 34, no 3, p. 447-465.
- Silva, A.P., Lima, C.L.C. et Vieites, R.L. 1998. «Caracterização química e física do jenipapo (*Genipa americana*) armazenado.» *Scientia Agricola*, vol. 55, no 1, p. 29-34.
- Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosman, G., Mello, A.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. 1999. *Farmacognosia - Da Planta Ao Medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, 809 p.
- Skalhegg, B.S., Landmark, B.F., Doskeland, S.O., Hansson, V., Lea, T., Jahnsen, T. 1992. «Cyclic AMP-dependent protein kinase type I mediates the inhibitory effects of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate on cell replication in human T lymphocytes.» *J Biol Chem*, vol. 267, no 22, p. 15707-15714.
- Skalski, V. 2004. Direction générale des produits de santé et des aliments Bulletin canadien des effets indésirables, Jan., vol 14, no 1, 2004.
- Slepchenko, B.M. et Bronner, F. 2001. «Modeling of transcellular Ca transport in rat duodenum points to coexistence of two mechanisms of apical entry.» *Am J Physiol Cell Physiol*, vol. 281, no 1, C270-281.
- Smit, M.J. et Iyengar, R. 1998. «Mammalian Adenylyl Cyclases.» *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*, vol. 32, p. 1-21.
- Smit, M.J., Verzijl, D. et Iyengar, R. 1998. «Identity of Adenylyl Cyclase isoform determines the rate of cell cycle progression in NIH 3T3 Cells.» *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 95, no 25, p. 15084-15089.
- Smith, C.H., Moe, A.J. et Ganapathy, V. 1992. «Nutrient transport pathways across the epithelium of the placenta.» *Annu Rev Nutr*, vol. 12, p. 183-206.

- Song, M., Hang, T. J., Wang, Y., Jiang, L., Wu, X. L., Zhang, Z., Shen, J., Zhang, Y. 2006. Determination of oleanolic acid in human plasma and study of its pharmacokinetics in Chinese healthy male volunteers by HPLC tandem mass spectrometry.» *J Pharm Biomed Anal*, vol. 40, no 1, p. 190-196.
- Souza, C.N. 2007. Characteristics bromatologic of three types of fruits of differents germoplasms of genipap (*Genipa americana* L.). Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, da Universidade Estadual de Santa Cruz, UESC, Ihéus, Bahia, Brazil, p. 58.
- Stadtmauer, L. et Rosen, O.M. 1986. «Increasing the cAMP content of IM-9 cells alters the phosphorylation state and protein kinase activity of the insulin receptor.» *J Biol Chem* 261, no 7, p. 3402-3407.
- Stea, A., Soong, T.W. et Snutch, T.P.,1995. «Determinants of PKC-dependent modulation of a family of neuronal calcium channels.» *Neuron*, vol. 15, no 4, p. 929-940.
- Stokoe, D., Engel, K., Campbell, D.G., Cohen, P., Gaestel, M. 1992. «Identification of MAPKAP Kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins.» *FEBS Lett*, vol. 313, no 3, p. 307-313.
- Strauss, J.F., 3rd, Kido, S., Sayegh, R., Sakuragi, N., Gafvels, M.E. 1992. «The cAMP signalling system and human trophoblast function.» *Placenta*, vol. 13, no 5, p. 389-403.
- Strid, H. et Powell, T.L. 2000. «ATP-dependent Ca^{2+} transport is up-regulated during third trimester in human syncytiotrophoblast basal membranes.» *Pediatr Res*, vol. 48, no 1, p. 58-63.
- Strid, H., Bucht, E., Jansson, T., Wennergren, M., Powell, T.L. 2003. «ATP dependent Ca^{2+} transport across basal membrane of human syncytiotrophoblast in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction or diabetes.» *Placenta*, vol. 24, no 5, p. 445-452.
- Strid, H., Care, A., Jansson, T., Powell, T. 2002. «Parathyroid hormone-related peptide (38-94) amide stimulates ATP-dependent calcium transport in the basal plasma membrane of the human syncytiotrophoblast.» *J Endocrinol*, vol. 175, no 2, p. 517-524.
- Stulc, J., Stulcova, B., Smid, M., Sach, I. 1994. «Parallel mechanisms of Ca^{++} transfer across the perfused human placental cotyledon.» *Am J Obstet Gynecol*, vol. 170, 1 Pt1, p. 162-167.
- Sudol, M., Greulich, H., Newman, L., Sarkar, A., Sukegawa, J., Yamamoto, T. 1993. «A novel Yes-related kinase, Yrk, is expressed at elevated levels in neural and hematopoietic tissues.» *Oncogene*, vol. 8, no 4, p. 823-831.
- Sullivan, M.H. 2004. «Endocrine cell lines from the placenta.» *Mol Cell Endocrinol*, vol. 228, no 1-2, p. 103-119.

- Sun, H., Charles, C.H., Lau, L.F., Tonks, N.K. 1993. «MKP-1 (3ch134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo.» *Cell*, vol. 75, no 3, p. 487-493.
- Sunahara, R.K. et Taussig, R. 2002. «Isoforms of mammalian Adenylyl Cyclase: multiplicities of signaling.» *Mol Interv*, vol. 2, no 3, p. 168-184.
- Sunahara, R.K., Dessauer, C.W. et Gilman, A.G. 1996. «Complexity and diversity of mammalian Adenylyl Cyclases.» *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, vol. 36, p. 461-480.
- Suzuki O, Katsumata Y, Oya M, Bladt S, Wagner H. 1984. «Inhibition of monoamine oxidase by hypericin.» *Planta Med*, vol. 50, no 3, p. 272-4.
- Syed DN, Afaq F, Kweon MH, Hadi N, Bhatia N, Spiegelman VS, Mukhtar H. 2007. «Green tea polyphenol EGCG suppresses cigarette smoke condensate-induced NF-kappaB activation in normal human bronchial epithelial cells.» *Oncogene*, vol. 26, no 5, p. 673-82.
- Syme, M.R., Paxton, J.W. et Keelan, J.A. 2004. «Drug transfer and metabolism by the human placenta.» *Clin Pharmacokinet*, vol. 43, no 8, p. 487-514.
- Takahashi, I., Nakanishi, S., Kobayashi, E., Nakano, H., Suzuki, K., Tamaoki, T. 1989. «Hypericin and pseudohypericin specifically inhibit protein kinase C: possible relation to their antiretroviral activity.» *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 165, no 3, p. 1207-12.
- Takekawa, M., Posas, F. et Saito, H. 1997. «A human homolog of the yeast Ssk2/Ssk22 MAP kinase kinase kinases, MTK1, mediates stress-induced activation of the P38 and JNK pathways.» *Embo J*, vol. 16, no 16, p. 4973-4982.
- Tan, Y., Rouse, J., Zhang, A., Cariati, S., Cohen, P., Comb, M.J. 1996. «FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving P38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2.» *Embo J*, vol. 15, no 17, p. 4629-4642.
- Tang, X., Gao, J., Chen, J., Fang, F., Wang, Y., Dou, H., Xu, Q., Qian, Z. 2005. «Inhibition by [Corrected] ursolic acid of [Corrected] calcium-induced mitochondrial permeability transition and release of two proapoptotic proteins.» *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 337, no 1, p. 320-324.
- Taoubi, K., Fauvel, M.T., Gleye, J., Moulis, C., Fouraste, I. 1997. «Phenylpropanoid glycosides from *Lantana camara* and *Lippia multiflora*.» *Planta Med*, vol. 63, no 2, p. 192-193.
- Tapia, R. et Velasco, I. 1997. «Ruthenium red as a tool to study calcium channels, neuronal death and the function of neural pathways.» *Neurochem Int*, vol. 30, no 2, p. 137-147.
- Tasken, K. et Aandahl, E.M. 2004. «Localized effects of cAMP mediated by distinct Routes of protein kinase A.» *Physiol Rev*, vol. 84, no 1, p. 137-167.

- Tasken, K., Skalhegg, B.S., Tasken, K.A., Solberg, R., Knutsen, H.K., Levy, F.O., Sandberg, M., Orstavik, S., Larsen, T., Johansen, A.K., Vang, T., Schrader, H.P., Reinton, N.T., Torgersen, K.M., Hansson, V. et Jahnsen, T. 1997. «Structure, function, and regulation of human cAMP-dependent protein kinases.» *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*, vol. 31, p. 191-204.
- Taussig, R., Iniguez-Lluhi, J.A. et Gilman, A.G. 1993. «Inhibition of Adenylyl Cyclase by Gi alpha.» *Science*, vol. 261, no 5118, p. 218-221.
- Taussig, R., Tang, W.J., Hepler, J.R. et Gilman, A.G. 1994. «Distinct patterns of didirectional regulation of mammalian Adenylyl Cyclases.» *J Biol Chem*, vol. 269, no 8, p. 6093-6100.
- Taylor, C.M., Stevens, H., Anthony, F.W. et Wheeler, T., 1997. «Influence of hypoxia on vascular endothelial growth factor and chorionic gonadotrophin production in the trophoblast-derived cell lines: JEG, JAR and BeWo.» *Placenta*, vol. 18, no 5-6, p. 451-458.
- Taylor, R.N., Newman, E.D. et Chen, S.A., 1991. «Forskolin and methotrexate induce an intermediate trophoblast phenotype in cultured human choriocarcinoma cells.» *Am J Obstet Gynecol*, vol. 164, 1 Pt1, p. 204-210.
- Taylor, S.S. 1989. cAMP-Dependent Protein Kinase. «Model for an enzyme family.» *J Biol Chem*, vol. 264, no 15, p. 8443-8446.
- Theodossis, T.A., Noronha-Dutra, A. et Hothersall, J.S. 2006. «Mitochondria are a primary target of hypericin phototoxicity: synergy of intracellular calcium mobilisation in cell killing.» *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 38, p. 1946-1956.
- Thiele, H., Berger, M., Lenzner, C., Kuhn, H., Thiele, B.J. 1998. «Structure of the promoter and complete sequence of the gene coding for the rabbit translationally controlled tumor protein (TCTP) p23.» *Eur J Biochem*, vol. 257, no 1, p. 62-68.
- Thiele, H., Berger, M., Skalweit, A., Thiele, B.J. 2000. «Expression of the gene and processed pseudogenes encoding the human and rabbit translationally controlled tumour protein (TCTP).» *Eur J Biochem*, vol. 267, no 17, p. 5473-5481.
- Tholl, D. 2006. «Terpene Synthases and the Regulation, Diversity and Biological Roles of Terpene Metabolism.» *Curr Opin Plant Biol*, vol. 9, no 3, p. 297-304.
- Thomas, G. et Hall, M.N. 1997. «TOR signalling and control of cell growth.» *Curr Opin Cell Biol*, vol. 9, no 6, p. 782-787.
- Thomas, G. et Thomas, G. 1986. «Translational control of mRNA expression during the early mitogenic response in Swiss mouse 3T3 cells: identification of specific proteins.» *J Cell Biol*, vol. 103, 6 Pt1, p. 2137-2144.

- Thomas, G., Haavik, J. et Cohen, P. 1997. «Participation of a stress-activated protein kinase cascade in the activation of tyrosine hydroxylase in chromaffin cells.» *Eur J Biochem*, vol. 247, no 3, p. 1180-1189.
- Thomas, S.M. et Brugge, J.S. 1997. «Cellular functions regulated by Src family kinases.» *Annu Rev Cell Dev Biol*, vol. 13, p. 513-609.
- Thomasset, M., Desplan, C., Moukhtar, M., Mathieu, H. 1981. «Primary translation product of mRNA coding for rat duodenal vitamin D-dependent calcium-binding protein.» *FEBS Lett*, vol. 134, no 2, p. 178-182.
- Thornburg, K.L., Burry, K.J., Adams, A.K., Kirk, E.P., Faber, J.J. 1988. «Permeability of placenta to inulin.» *Am J Obstet Gynecol*, vol. 158, no 5, p. 1165-1169.
- Tibbles, L.A., Ing, Y.L., Kiefer, F., Chan, J., Iscove, N., Woodgett, J.R., Lassam, N.J. 1996. «MLK-3 activates the SAPK/JNK and P38/Rk pathways via SEK1 and MKK3/6.» *Embo J*, vol. 15, no 24, p. 7026-7035.
- Ticktin, T. et Dalle, S.P. 2005. «Medicinal plant use in the practice of midwifery in rural Honduras.» *J Ethnopharmacol*, vol. 96, no 1-2, p. 233-248.
- Tiran, D. 2003. «The use of herbs by pregnant and childbearing women: a risk-benefit assessment.» *Complement Ther Nurs Midwifery*, vol. 9, no 4, p. 176-181.
- Touyz, R.M. et Yao, G. 2003. «Modulation of vascular smooth muscle cell growth by magnesium-role of mitogen-activated protein kinases.» *J Cell Physiol*, vol. 197, no 3, p. 326-335.
- Trump, B.F. et Berezsky, I.K. 1996. «The role of altered $[Ca^{2+}]_i$ regulation in apoptosis, oncosis, and necrosis.» *Biochim Biophys Acta*, vol. 1313, p. 173-178.
- Tsien, R.W., Ellinor, P.T. et Horne, W.A. 1991. «Molecular diversity of voltage-dependent Ca^{2+} channels.» *Trends Pharmacol Sci*, vol. 12, no 9, p. 349-354.
- Tuan, R.S., Moore, C.J., Brittingham, J.W., Kirwin, J.J., Akins, R.E., Wong, M. 1991. «In vitro study of placental trophoblast calcium uptake using JEG-3 human choriocarcinoma cells.» *J Cell Sci*, vol. 98, Pt 3, p. 333-342.
- Ueda, S., Iwahashi, Y. et Tokuda, H. 1991. «Production of anti-tumor-promoting iridoid glucosides in *Genipa americana* and its cell cultures.» *J Nat Prod*, vol. 54, no 6, p. 1677-80.
- Ui, M., Sonobe, M.H., Ito, T., Murakami, M., Okazaki, S., Takada, M., Sato, T., Iba, H. 1998. «Biochemical and functional analysis of highly phosphorylated forms of C-Jun protein.» *FEBS Lett*, vol. 429, no 3, p. 289-294.

- Ulloa-Aguirre, A., Mendez, J.P., Cravioto, A., Grotjan, E., Damian-Matsumura, P., Espinoza, R. 1990. «Studies on the microheterogeneity of chorionic gonadotrophin secreted by the human cytotrophoblast in culture.» *Hum Reprod*, vol. 5, no 6, p. 661-669.
- Ushigome, F., Takanaga, H., Matsuo, H., Yanai, S., Tsukimori, K., Nakano, H., Uchiumi, T., Nakamura, T., Kuwano, M., Ohtani, H., Sawada, Y. 2000. «Human placental transport of vinblastine, vincristine, digoxin and progesterone: contribution of P-glycoprotein.» *Eur J Pharmacol*, vol. 408, no 1, p. 1-10.
- Vaillancourt, C., Lanoix, D., Le Bellego, F., Daoud, G., Lafond, J. 2009. «Involvement of MAPK signalling in human villous trophoblast differentiation.» *Mini Rev Med Chem*, vol. 9, no 8, p. 962-973.
- van den Bout-van den Beukel, C.J., Koopmans, P.P., van der Ven, A.J., De Smet, P.A., Burger, D.M. 2006. «Possible drug-metabolism interactions of medicinal herbs with antiretroviral agents.» *Drug Metab Rev*, vol. 38, no 3, p. 477-514.
- van der Aa, E.M., Copius Peereboom-Stegeman, J.H., Russel, F.G., 1995. «Isolation of syncytial microvillous membrane vesicles from human term placenta and their application in drug-nutrient interaction studies.» *J Pharmacol Toxicol Methods*, vol. 34, no 1, p. 47-56.
- van Kreel, B.K. et van Dijk, J.P. 1983. «Mechanisms involved in the transfer of calcium across the isolated guinea pigs placenta.» *J Dev Physiol*, vol. 5, no 3, p. 155-165.
- Vargas, A., Moreau, J., Landry, S., LeBellego, F., Toufaily, C., Rassart, E., Lafond, J., Barbeau, B. 2009. «Syncytin-2 plays an important role in the fusion of human trophoblast cells.» *J Mol Biol*, vol. 392, no 2, p. 301-318.
- Vargas, A., Moreau, J., Le Bellego, F., Lafond, J., Barbeau, B. 2008. «Induction of trophoblast cell fusion by a protein tyrosine phosphatase inhibitor.» *Placenta*, vol. 29, no 2, p. 170-174.
- Veiga Junior, V.F. et Pinto, A.C. 2005. «Plantas medicinais: cura segura?» *Quimica Nova*, vol. 28, p. 519-528.
- Veiga Junior, V.F. 2008. «Estudo do consumo de plantas medicinais na região centro-norte do estado do Rio de Janeiro : aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população.» *Revista Brasileira de Farmacognosia/Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol. 18, no 2, p. 308-313.
- Venters, R.A., Benson, L.M., Craig, T.A., Bagu, J., Paul, K.H., Kordys, D.R., Thompson, R., Naylor, S., Kumar, R., Cavanagh, J. 2003. «The effects of Ca²⁺ binding on the conformation of clbindin D(28k): a nuclear magnetic resonance and microelectrospray mass spectrometry study.» *Anal Biochem*, vol. 317, no 1, p. 59-66.

- Voets, T. et Nilius, B. 2003. «The pore of TRP channels: trivial or neglected?» *Cell Calcium*, vol. 33, no 5-6, p. 299-302.
- Vogel, V.J. 1970. American Indian Medicine. In: *The Civilization of the American Indian series*, Norman: University of Oklahoma Press, p. 20.
- Wadsack, C., Hrzencjak, A., Hammer, A., Hirschmugl, B., Levak-Frank, S., Desoye, G., Sattler, W., Malle, E. 2003. «Trophoblast-like human choriocarcinoma cells serve as a suitable in vitro model for selective cholesteryl ester uptake from high density lipoproteins.» *Eur J Biochem*, vol. 270, no 3, p. 451-462.
- Wagner, P.J., Jester, D., LeClair, B., Taylor, A.T., Woodward, L., Lambert, J. 1999. «Taking the edge off: why patients choose St. John's Wort.» *J Fam Pract*, vol. 48, no 8, p. 615-9.
- Wan, P.T., Garnett, M.J., Roe, S.M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V.M., Jones, C.M., Marshall, C.J., Springer, C.J., Barford, D., Marais, R. 2004. «Mechanism of activation of the Raf-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-Raf.» *Cell*, vol. 116, no no 6, p. 855-867.
- Wang, Y.G., Dedkova, E.N., Ji, X., Blatter, L.A., Lipsius, S.L. 2005. «Phenylephrine acts via IP3-dependent intracellular no release to stimulate L-type Ca^{2+} Current in Cat Atrial Myocytes.» *J Physiol*, vol. 567, Pt1, p. 143-157.
- Wartmann, M., Hofer, P., Turowski, P., Saltiel, A.R., Hynes, N.E. 1997. «Negative modulation of membrane localization of the Raf-1 protein kinase by hyperphosphorylation.» *J Biol Chem*, vol. 272, no 7, p. 3915-3923.
- Waskiewicz, A.J., Flynn, A., Proud, C.G., Cooper, J.A., 1997. «Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases MNK1 and MNK2.» *Embo J*, vol. 16, no 8, p. 1909-1920.
- Wasserman, R.H., Taylor, A.N. et Kallfelz, F.A. 1966. «Vitamin D and transfer of plasma calcium to intestinal lumen in chicks and rats. » *Am J Physiol*, vol. 211, no 2, p. 419-23.
- Watson, E.D. et Cross, J.C. 2005. «Development of structures and transport functions in the mouse placenta.» *Physiology (Bethesda)*, vol. 20, p. 180-193.
- Weber, K., Erben, R.G., Rump, A. , Adamski, J. 2001. «Gene structure and regulation of the murine epithelial calcium channels Ecac1 and 2.» *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 289, no 5, p. 1287-1294.
- Wellbrock, C., Karasarides et M., Marais, R. 2004. «The Raf proteins take centre stage.» *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 5, no 11, p. 875-885.

- Wentworth, J.M., Agostini, M., Love, J., Schwabe, J.W., Chatterjee, V.K. 2000. «St John's Wort, a herbal antidepressant, activates the steroid X receptor.» *J Endocrinol*, vol. 166, no 3, R11-16.
- Whalen, A.M., Galasinski, S.C., Shapiro, P.S., Nahreini, T.S., Ahn, N.G. 1997. «Megakaryocytic differentiation induced by constitutive activation of mitogen-activated protein kinase kinase.» *Mol Cell Biol*, vol. 17, no 4, p. 1947-1958.
- Whitehurst, A., Cobb, M.H. et White, M.A. 2004. «Stimulus-coupled spatial restriction of extracellular signal-regulated kinase 1/2 activity contributes to the specificity of signal-response pathways.» *Mol Cell Biol*, vol. 24, no 23, p. 10145-10150.
- Whitley, G.S.J. 2006. Production of Human Trophoblast Cell Lines. In: *Placenta and Trophoblast - Methods and Protocols*, Hunt, M. (Ed.), Totowa, New Jersey: Humana Press p. 219-228.
- Whitmarsh, A.J. et Davis, R.J. 1998. «Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals.» *Trends Biochem Sci*, vol. 23, no 5383, p. 481-485.
- Whitmarsh, A.J., Cavanagh, J., Tournier, C., Yasuda, J., Davis, R.J. 1998. A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation.» *Science*, vol. 281, no 12, p. 1671-1674.
- Wice, B., Menton, D., Geuze, H., Schwartz, A.L. 1990. «Modulators of cyclic AMP metabolism induce syncytiotrophoblast formation in vitro.» *Exp Cell Res*, vol. 186, no 2, p. 306-316.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B., Johnson, G.L. 1999. «Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human.» *Physiol Rev*, vol. 79, no 1, p. 143-180.
- Wilkinson, J.M., 2000. «Effect of ginger tea on the fetal development of Sprague-Dawley rats.» *Reprod Toxicol*, vol. 14, no 6, p. 507-512.
- Williams, M.E., Washburn, M.S., Hans, M., Urrutia, A., Brust, P.F., Prodanovich, P., Harpold, M.M., Stauderman, K.A. 1999. «Structure and functional characterization of a novel human low-voltage activated calcium channel.» *J Neurochem*, vol. 72, no 2, p. 791-799.
- Williams, R., Sanghera, J., Wu, F., Carbonaro-Hall, D., Campbell, D.L., Warburton, D., Pelech, S., Hall, F. 1993. «Identification of a human epidermal growth factor receptor-associated protein kinase as a new member of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated protein kinase family.» *J Biol Chem*, vol. 268, no 24, p. 18213-18217.
- Williamson, E.M., Okpako, D.T. et Evans, F.J. 1996. *Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 228 p.

- Willis, D.M., O'Grady, J.P., Faber, J.J., Thornburg, K.L. 1986. «Diffusion permeability of cyanocobalamin in human placenta.» *Am J Physiol*, vol. 250, no 3 Pt2, R459-464.
- Wilson, C., Heberle-Bors, E., Vicente, O., 1997. «A conserved motif at the carboxy terminus of MAP kinases.» *J Mol Evol*, vol. 44, no 6, p. 683-685.
- Wissenbach, U., Niemeyer, B.A., Fixemer, T., Schneidewind, A., Trost, C., Cavalie, A., Reus, K., Meese, E., Bonkhoff, H., Flockerzi, V., 2001. «Expression of Cat-like, a novel calcium-selective channel, correlates with the malignancy of prostate cancer.» *J Biol Chem*, vol. 276, no 22, p. 19461-19468.
- Wloch, S., Palasz, A., Kaminski, M., 2009. «Active and passive transport of drugs in the human placenta.» *Ginekol Pol*, vol. 80, no 10, p. 772-777.
- Wolfe, M.W. 2006. «Culture and transfection of human choriocarcinoma cells.» *Methods Mol Med*, vol. 121, p. 229-239.
- Wollenweber, E.D., M., Muniappan, R. et Siems, K, 1997. «Flavonoid aglycones and triterpenoids from the leaf exudate of *Lantana camara* and *Lantana montevidensis*.» *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 25, no 3, p. 269-270.
- Wood, T.L., Kobayashi, Y., Frantz, G., Varghese, S., Christakos, S., Tobin, A.J. 1988. «Molecular cloning of mammalian 28,000 Mr vitamin D-dependent calcium binding protein (Calbindin-D28k): expression of calbindin-D28k RNAs in rodent brain and kidney.» *DNA*, vol. 7, no 9, p. 585-593.
- Wurglics, M. et Schubert-Zsilavec, M. 2006. «*Hypericum perforatum*: a 'modern' herbal antidepressant: pharmacokinetics of active ingredients.» *Clin Pharmacokinet*, vol. 45, no 5, p. 449-468.
- Wuttke, W., Jarry, H., Christoffel, V., Spengler, B., Seidlová-Wuttke, D. 2003. «Chaste tree (*Vitex agnus-castus*) - pharmacology and clinical indications.» *Phytomedicine*, vol. 10, no 4, p. 348-57.
- Xavier, C.P., Lima, C.F., Fernandes-Ferreira, M., Pereira-Wilson, C. 2009a. «*Salvia fruticosa*, *Salvia officinalis*, and rosmarinic acid induce apoptosis and inhibit proliferation of human colorectal cell lines: the role in MAPK/ERK pathway.» *Nutr Cancer*, vol. 61, no 4, p. 564-71.
- Xavier, C.P., Lima, C.F., Preto, A., Seruca, R., Fernandes-Ferreira, M., Pereira-Wilson, C. 2009b. «Luteolin, luerctin and ursolic acid are potent inhibitors of proliferation and inducers of apoptosis in both Kras and Braf mutated human colorectal cancer cells.» *Cancer Lett*, vol. 281, no 2, p. 162-170.
- Xiao, Y.Q., Malcolm, K., Worthen, G.S., Gardai, S., Schiemann, W.P., Fadok, V.A., Bratton, D.L., Henson, P.M. 2002. «Cross-talk between ERK and P38 MAPK mediates selective

- suppression of pro-inflammatory cytokines by transforming growth factor-beta.» *J Biol Chem*, vol. 277, no 17, p. 14884-14893.
- Xu, A., Bellamy, A.R. et Taylor, J.A., 1999. «Expression of translationally controlled tumour protein is regulated by calcium at both the transcriptional and post-transcriptional level.» *Biochem J*, vol. 342, Pt 3, p. 683-689.
- Yamakage, M. et Namiki, A. 2002. «Calcium channels - basic aspects of their structure, function and gene encoding; anesthetic action on the channels - a review.» *Can J Anaesth*, vol. 49, no 2, p. 151-164.
- Yamano, T., Tsujimoto, Y., Noda, T., Shimizu, M., Ohmori, M., Morita, S., Yamada, A. 1990. «Hepatotoxicity of geniposide in rats.» *Food Chem Toxicol*, vol. 28, no 7, p. 515-519.
- Yarm, F.R. 2002. «PLK phosphorylation regulates the microtubule-dtabilizing protein TCTP.» *Mol Cell Biol*, vol. 22, no 17, p. 6209-6221.
- Yashwanth, R., Rama, S., Anbalagan, M., Rao, A.J. 2006. «Role of estrogen in regulation of cellular differentiation: a study using human placental and rat Leydig cells.» *Mol Cell Endocrinol*, vol. 246, no 1-2, p. 114-120.
- Yasuda, J., Whitmarsh, A.J., Cavanagh, J., Sharma, M., Davis, R.J. 1999. «The JIP group of mitogen-activated protein kinase scaffold proteins.» *Mol Cell Biol*, vol. 19, no 10, p. 7245-7254.
- Yoshimura, A., Yoshida, T., Seguchi, T., Waki, M., Ono, M., Kuwano, M. 1987. «Low binding capacity and altered O-linked glycosylation of low density lipoprotein receptor in a monensin-resistant mutant of chinese hamster ovary cells.» *J Biol Chem*, vol. 262, no 27, p. 13299-13308.
- Younes, M.A., Besch, N.F. et Besch, P.K. 1981. «Estradiol and progesterone binding in human term placental cytosol.» *Am J Obstet Gynecol*, vol. 141, no 2, p. 170-174.
- Young, P.R., McLaughlin, M.M., Kumar, S., Kassis, S., Doyle, M.L., McNulty, D., Gallagher, T.F., Fisher, S., McDonnell, P.C., Carr, S.A., Huddleston, M.J., Seibel, G., Porter, T.G., Livi, G.P., Adams, J.L. , Lee, J.C. 1997. «Pyridinyl imidazole inhibitors of P38 mitogen-activated protein kinase bind in the ATP site.» *J Biol Chem*, vol. 272, no 18, p. 12116-12121.
- Zachos, G., Clements, B. et Conner, J. 1999. «Herpes simplex virus type 1 infection stimulates P38/C-Jun N-terminal mitogen-activated protein kinase pathways and activates transcription factor AP-1.» *J Biol Chem*, vol. 274, no 8, p. 5097-5103.
- Zamponi, G.W. et Snutch, T.P. 1998. «Modulation of voltage-dependent calcium channels by G proteins.» *Curr Opin Neurobiol*, vol. 8, no 3, p. 351-356.

- Zhang, A.L., Story, D.F., Lin, V., Vitetta, L., Xue, C.C. 2008. «A population survey on the use of 24 common medicinal herbs in Australia.» *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, vol. 17, no 10, p. 1006-1013.
- Zhang, F., Strand, A., Robbins, D., Cobb, M.H., Goldsmith, E.J. 1994. «Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 Å resolution.» *Nature*, vol. 367, no 6465, p. 704-711.
- Zhang, S., Han, J., Sells, M.A., Chernoff, J., Knaus, U.G., Ulevitch, R.J., Bokoch, G.M. 1995. «Rho family GTPases regulate P38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator PAK1.» *J Biol Chem*, vol. 270, no 41, p. 23934-23936.
- Zylinska, L. et Soszynski, M. 2000. «Plasma membrane Ca²⁺-ATPase in excitable and nonexcitable cells.» *Acta Biochim Pol*, vol. 47, no 3, p. 529-539.
- Zylinska, L., Kawecka, I., Lachowicz, L., Szemraj, J. 2002. «The isoform- and location-dependence of the functioning of the plasma membrane calcium pump.» *Cell Mol Biol Lett* 7, no 4, p. 1037-1045.