

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

**ÉTUDE DE L'INFLUENCE D'UN KO EN PTHRP OU EN PTH1R SUR LE NIVEAU D'EXPRESSION
DES PROTÉINES DE MANUTENTION DU CALCIUM DANS LE PLACENTA DE SOURIS**

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

MARC AMYOT

Octobre 2008

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

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

REMERCIEMENTS

Je remercie le Dre Julie Lafond de m'avoir donné l'opportunité de me joindre à son équipe de recherche. Merci Julie de m'avoir fait confiance, de toujours m'avoir soutenu et surtout d'avoir cru en moi. Ta confiance et ton appréciation de mon travail ont toujours été palpables. Merci pour tous ces beaux moments. Mon séjour chez vous restera gravé. Merci Julie!

Je remercie Lucie Simoneau M.Sc pour ses nombreux conseils.

Je remercie Marie-Claude Charest M.Sc pour son support autant au laboratoire qu'avec le projet lipides.

Je remercie le Dre Cathy Vaillancourt et son équipe pour leurs précieux conseils.

Je remercie le Dr Georges Daoud pour m'avoir si bien épaulé et conseillé durant mes débuts et tout au long de mon apprentissage. Merci d'avoir fait de moi quelqu'un de plus critique. Merci patron!

Je remercie le Dr Éric Larose pour sa patience et sa compréhension durant la rédaction de ce mémoire.

Merci à toute l'équipe de l'animalerie pour leur aide si précieuse. Merci Normand, Luc, Kathy et Geneviève.

Merci à Maude Éthier-Chiasson M.Sc et Frédérique Le Bellego PhD pour leur aide indispensable durant les derniers miles de mon parcours.

Je remercie Mathilde Riols M.Sc pour son support, sa présence et son sourire. Merci d'avoir été là durant toutes ces épreuves.

Merci du support de mes deux meilleurs amis, Mathieu Laflamme et Guillaume Côté-Simard.

Merci à ma belle-famille. Merci Jean et Carole pour votre support et vos pensées positives. Merci Maude et Élise pour votre support.

Merci à ma mère et mon père d'avoir toujours été derrière moi durant toutes ces années. Persévérance et rigueur comme disait mon père!!

Merci à mon frère Yannick et Julie et toute leur magnifique famille, Elizabeth et Elliot. Merci de votre écoute et de vos encouragements.

Merci à ma sœur Caroline et mon frère Hans pour votre support inconditionnel et votre énergie positive.

Merci à ma conjointe, Ariane Gravel M. Sc pour son amour, ses encouragements et son support. Merci de m'avoir permis de réaliser un tel projet. Merci d'avoir été à mes côtés et d'avoir toujours cru en moi.

*JE DÉDIE CE TRAVAIL DE DUR LABEUR
À MON FRÈRE HANS.
MERCİ D'AVOIR CRU EN MOI
DEPUIS MA JEUNE ENFANCE.
TU ES UNE DES RAISONS POUR LAQUELLE
JE ME SUIS ACCOMPLI DANS LA VIE.*

TABLES DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	x
RÉSUMÉ.....	xiii
INTRODUCTION.....	1

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1	Le développement embryonnaire chez la souris.....	3
	1.1.1 La placentation.....	3
	1.1.2 De la fécondation au vingt-et-unième jour.....	5
	1.1.3 L'embryon de souris.....	11
1.2	Le calcium	11
	1.2.1 Les différentes formes de calcium.....	11
	1.2.2 Source de calcium pour le fœtus.....	12
	1.2.3 Équilibre calcique maternel durant la grossesse.....	13
1.3	Le peptide apparenté à la parathormone (PTHrP).....	14
	1.3.1 Généralités.....	14
	1.3.2 Le peptide apparenté à la parathormone : différent de la parathormone.....	15
	1.3.3 Structure et fonctions du peptide apparenté à la parathormone.	16
	1.3.4 Le récepteur du peptide apparenté à la parathormone(PTH1R)...	19

1.4	Les pompes à calcium PMCA1 et PMCA4 (« plasma-membrane Ca ²⁺ -ATPase »).....	22
1.5	Les canaux TRPV5 et TRPV6 (« Transient receptor potential vanilloid »)...	25
1.6	Les protéines de liaison au calcium CaBP-9k et CaBP-28k, « calcium-binding protein »	27
1.7	Les échangeurs à sodium-calcium NCX1, NCX2, NCX3, « sodium-calcium exchanger ».....	30
1.8	Le TCTP, « translationally controlled tumour protein ».....	32
1.9	La vitamine D et le récepteur à la vitamine D (VDR), « vitamin-D receptor »...	34
1.10	BUT DU PROJET.....	37
1.11	HYPOTHÈSES DE RECHERCHE.....	37
 CHAPITRE II		
	ARTICLE SCIENTIFIQUE.....	38
2.1	ABSTRACT.....	40
2.2	INTRODUCTION.....	41
2.3	MATERIALS AND METHODS.....	43
2.4	RESULTS.....	46

2.5	DISCUSSION.....	49
2.6	FIGURE LEGEND.....	55
2.7	TABLES.....	60
2.8	REFERENCES.....	63
2.9	FIGURES.....	66
 CHAPITRE III		
	CONCLUSION.....	79
	RÉFÉRENCES.....	83

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Le placenta trichorial de la souris.....	15
1.2 Étapes du développement embryonnaire chez la souris.....	16
1.3 Développement embryonnaire et implantation chez la souris.....	17
1.4 Développement des structures formant le placenta de la souris	18
1.5 Développement des structures formant le placenta de la souris	19
1.6 Comparaison entre le développement évolutif du placenta de souris et celui de l'humain.....	20
1.7 Structure du placenta de souris.....	21
1.8 Comparaison de la structure du gène de la PTHrP à celle de la PTH.....	9
1.9 Les effecteurs situés en aval du récepteur à la PTHrP.....	12
1.10 Internalisation du récepteur PTH1R.....	13
1.11 Modèle en deux dimensions de PMCA lors d'une stimulation à la Ca ²⁺ -Calmoduline.....	23
1.12 Modèle en deux dimensions de PMCA lors d'une autoinhibition.....	23
1.13 Schématisation d'un canal de type TRPV.....	26
1.14 Structure tridimensionnelle du motif « EF-hand » des CaBPs.....	28
1.15 La phylogénie des CaCA montrant la famille des NCX.....	30
1.16 Représentation tridimensionnelle de la TCTP.....	33
1.17 Structure chimique de la vitamine D ₃	34
2.1 Ionized calcium measured in, wild-type, heterozygosis and null fetuses In a) PTHrP b) PTH1R colonies.....	66
2.2 Effect of a knockout a) in PTHrP or b) PTH1R on placental gene expression of PMCA1.....	67
2.3 Effect of a knockout a) in PTHrP or b) PTH1R on placental gene expression of PMCA4.....	68

2.4	Effect of a knockout a) in PTHrP or b) PTH1R on placental gene expression of TRPV5.....	69
2.5	Effect of a knockout a) in PTHrP or b) PTH1R on placental gene expression of TRPV6.....	70
2.6	Effect of a knockout a) in PTHrP or b) PTH1R on placental gene expression of CaBP-9k.....	71
2.7	Effect of a knockout a) in PTHrP or b) PTH1R on placental gene expression of CaBP-28k.....	72
2.8	Effect of a knockout a) in PTHrP or b) PTH1R on placental gene expression of NCX1.....	73
2.9	Effect of a knockout a) in PTHrP or b) PTH1R on placental gene expression of NCX2.....	74
2.10	Effect of a knockout a) in PTHrP or b) PTH1R on placental gene expression of NCX3.....	75
2.11	Effect of a knockout a) in PTHrP or b) PTH1R on placental gene expression of TCTP.....	76
2.12	Effect of a knockout a) in PTHrP or b) PTH1R on placental gene expression of VDR.....	77
2.13	Overall representation of how mRNA expression of calcium-handling proteins is being regulated when deleting a) the PTHrP or b) the PTH1R in the mouse placenta.....	78
3.1	Vue d'ensemble de l'effet d'une délétion en a) PTHrP et en b) PTH1R sur le niveau d'expression des ARNm des protéines de manutention du calcium présentes dans le placenta de souris.....	80

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AC	Adénylate cyclase
ATP	Adénosine triphosphate
CABP-9k	Protéine de liaison au calcium de type 9k
CABP-28k	Protéine de liaison au calcium de type 28k
CAM	Calmoduline
CAT1	Protéine de transport du calcium de type 1
CAT2	Protéine de transport du calcium de type 2
CASR	Récepteur senseur de calcium
CGMP	Guanosine monophosphate cyclique
CO ₂	Dioxyde de carbone
DAG	Diacylglycérol
g	Gramme
GRK	Protéine kinase associée au récepteur à protéine G
HHM	Hypercalcémie humorale maligne
HRF	Facteur de relâchement de l'histamine
IP3	Inositol 1,4,5-triphosphate
kb	Kilobases
Kpb	Kilo paires de bases
KO	Knockout
Mg	Milligramme

NCX	Échangeur de sodium calcium
NCX1	Échangeur de sodium calcium de type 1
NCX2	Échangeur de sodium calcium de type 2
NCX3	Échangeur de sodium calcium de type 3
P1	Promoteur 1
P2	Promoteur 2
P3	Promoteur 3
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
PMCA	Pompe à calcium de la membrane plasmique
PMCA1	Pompe à calcium de type 1 de la membrane plasmique
PMCA2	Pompe à calcium de type 2 de la membrane plasmique
PMCA3	Pompe à calcium de type 3 de la membrane plasmique
PMCA4	Pompe à calcium de type 4 de la membrane plasmique
PPI	Pyrophosphate inorganique
PTH	Parathormone
PTH1R	Récepteur de type 1 à la parathormone
PTH2R	Récepteur de type 2 à la parathormone
PTH3R	Récepteur de type 3 à la parathormone
PTHRP	Peptide apparenté à la parathormone

S100	Protéine de liaison au calcium à chaîne polypeptidique de 100 acides aminés
TCTP	Protéine tumorale à traduction contrôlée
TRPV	Récepteur transitoire à potentiel vanilloïde
TRPV5	Récepteur transitoire à potentiel vanilloïde de type 5
TRPV6	Récepteur transitoire à potentiel vanilloïde de type 6
VDR	Récepteur à la vitamine D

RÉSUMÉ

Le peptide apparenté à la parathormone (PTHrP) est un régulateur important du transport de calcium placentaire durant la gestation. Une concentration adéquate de calcium est requise afin d'assurer la croissance et le bon développement du fœtus. Dans la présente étude, l'impact d'une délétion en PTHrP ou en son récepteur (PTH1R) a été mesuré dans le placenta de souris. L'usage d'un tel modèle animal a permis d'évaluer l'importance de la PTHrP dans le transport de calcium placentaire mais également les répercussions de telles délétions sur l'expression d'ARNm des protéines de manutention du calcium («calcium handling proteins») présentes dans le placenta (TRPVs, CaBPs, PMCA, NCXs, TCTP et VDR). Les mesures de calcium ionisé récoltées dans le sang fœtal et maternel ont été effectuées *in situ* en utilisant un analyseur à électrolytes et de sang total. L'évaluation des niveaux d'expression d'ARNm des différentes protéines de manutention du calcium a été rendue possible grâce à la technique de PCR en temps réel. Les résultats obtenus ont démontré que la perte en PTHrP ou en PTH1R engendre une réduction significative du calcium ionisé dans la circulation fœtale. Le niveau de calcium ionisé mesuré, chez les fœtus ayant subi une délétion en PTHrP ou en PTH1R, est inférieur à celui de la souche sauvage mais équivalent à celui des mères. Dans les placentas de souris délétées en PTHrP, l'expression des gènes de TRPV6 et de TCTP est augmentée contrairement à celle des placentas de la souche sauvage. La délétion du récepteur PTH1R a eu une influence remarquable sur l'expression des médiateurs de calcium CaBP-9k et TCTP mais également sur le récepteur à la vitamine D (VDR). Toujours en comparaison avec les placentas de la souche sauvage, le TCTP et le VDR se sont vus réprimés dans les placentas délétés en PTH1R. L'expression du TRPV5, responsable de l'intrusion du calcium dans le placenta, a également été réduite. D'un autre côté, l'expression d'ARNm de la CaBP-9k a doublé par rapport au niveau d'expression basal lors d'une dysfonction du récepteur. Ces données démontrent donc que la TRPV6 et le TCTP sont les principales protéines de manutention du calcium réagissant à une délétion de la PTHrP. Dans les placentas délétés en PTH1R, aucune variation dans l'expression des ARNm des canaux responsables de l'expulsion du calcium vers la circulation fœtale (les PMCA et les NCX) a été remarquée. Pour ce qui est de l'expression de l'ARNm des TRPV, responsables de l'entrée de calcium vers le placenta, elle s'est vue diminuer pour TRPV5 mais inchangée pour TRPV6. Encore une fois, dans ces placentas, l'expression des médiateurs de calcium intracellulaire a été réduite pour le TCTP, inchangée pour la CaBP-28k mais augmentée dans le cas de la CaBP-9k. En conclusion, le transport de calcium placentaire est sans aucun doute réduit lors d'une délétion en PTHrP ou en PTH1R. L'expression des ARNm des protéines de manutention du calcium présentes dans le placenta varie suite à la perte de la PTHrP ou du récepteur PTH1R. Étonnamment, aucune modification significative n'a été constatée dans l'expression des ARNm des protéines responsables de l'extrusion du calcium.

Mots clés : Placenta, calcium, PTHrP, PTH1R, «calcium handling proteins».

INTRODUCTION

Le calcium est un des éléments les plus abondants du corps humain. Il est un composant majeur des dents [1] et est essentiel à la formation des os et à la minéralisation du squelette [2]. La forme active du calcium, le calcium ionisé, est impliquée dans plusieurs processus biologiques tels l'apoptose et la régulation du cycle cellulaire. Le calcium ionisé possède également la capacité d'agir comme un messager intracellulaire [3, 4].

Une concentration adéquate de calcium est requise pour le fœtus pour assurer sa croissance et son bon développement [5, 6]. De nombreuses études chez l'humain ont démontré qu'un apport insuffisant de calcium pour le fœtus entraîne de l'ostéoporose chez l'adulte [7]. Chez la souris, le principal transfert de calcium survient lors des cinq derniers jours de la gestation, correspondant à la période de minéralisation du squelette [8]. La mère représente la seule source de calcium pour son fœtus. Durant une gestation normale chez la souris, le sang maternel est hypocalcémique par rapport à celui du fœtus. Un gradient calcique est donc établi entre la mère et son fœtus [9]. Au total, 12 mg de calcium sont transférés durant le dernier tiers de la gestation chez le rat [10].

Trois étapes résument le parcours du calcium avant son entrée dans la circulation fœtale. Il y a d'abord intrusion du calcium dans la barrière placentaire. Des médiateurs intracellulaires prennent en charge le calcium et facilitent son passage à travers la membrane. Le calcium est ensuite expulsé du placenta pour se retrouver dans la circulation fœtale [11]. Les TRPV5 et TRPV6 sont les canaux retrouvés du côté maternel du placenta et sont responsables de l'entrée du calcium [12]. Les CaBP-9k, CaBP-28k et TCTP présents dans le milieu intracellulaire s'agrippent au calcium pour le diriger vers les canaux responsables de l'expulser dans le sang du fœtus [13-18]. Le calcium passe ensuite à travers la membrane du côté fœtal du placenta via les PMCA1, PMCA4, NCX1, NCX2, NCX3 et devient disponible pour le fœtus [19-23]. Ces différentes protéines impliquées dans le transport du calcium

placentaire sont dites protéines de manutention du calcium et sont principalement régulées par une hormone calciotropique appelée peptide apparenté à la parathormone (PTHrP).

La PTHrP est un important régulateur du transport de calcium placentaire durant la gestation [24]. La PTHrP est une hormone oncofoetale produite tout au long du développement fœtal par les glandes parathyroïdes, le syncytiotrophoblaste, l'amnion, le chorion et le cordon ombilical [11]. Retrouvée en grande partie dans le liquide amniotique, la PTHrP stimule la différenciation cellulaire ainsi que le transfert de calcium [25]. Il a été démontré dans un modèle murin ayant subi une délétion en PTHrP ou en son récepteur (PTH1R), que le niveau de calcium ionisé présent dans la circulation fœtale était réduit [26]. Par ailleurs, lors d'une altération de la PTHrP, les niveaux d'expression des protéines de manutention du calcium varient. L'expression de la CaBP-9k est fortement réduite lors d'une délétion en PTHrP dans le sac vitellin intraplacentaire [27].

Il est de plus en plus évident que la présence de la PTHrP et de son récepteur PTH1R dans l'environnement fœtale représente un élément clé permettant le transport adéquat de calcium vers le fœtus.

L'objet de cette recherche est d'étudier l'effet d'une délétion en PTHrP ou en son récepteur PTH1R sur le transport de calcium placentaire mais également sur l'expression des protéines de manutention du calcium retrouvées dans le placenta de souris (les TRPVs, les PMCAs, les NCXs, les CaBPs, le VDR et le TCTP).

CHAPITRE I

ÉTATS DES CONNAISSANCES

1.1 Le développement embryonnaire chez la souris

1.1.1 La placentation

Dans le cadre de cette expérience, un modèle animal, plus particulièrement celui de la souris, a été utilisé pour effectuer les expérimentations. Le modèle murin a été sélectionné pour notre recherche puisqu'au niveau des mécanismes moléculaires du développement placentaire, celui-ci présente de nombreuses similitudes à celui de l'humain [28]. Le placenta murin possède également une structure et des fonctions similaires à celui de l'humain [29]. De plus, plusieurs facteurs de transcriptions impliqués dans l'expression de plusieurs gènes du placenta ont été observés autant dans le placenta humain que murin [28, 30, 31].

Le placenta est un organe transitoire agissant comme une barrière sélective entre la circulation maternelle et la circulation fœtale. Le placenta permet de maintenir un apport constant de nutriments pour le fœtus. Le placenta régule autant les échanges gazeux que métaboliques et est responsable de l'évacuation des déchets [30].

L'humain et la souris possèdent une structure placentaire similaire dite hémochoriale. Chez la souris, la placentation est du type trichorial (Figure 1.1). Le placenta est composé de trois types de cellules trophoblastiques : les cellules du labyrinthe, les spongiotrophoblastes et les trophoblastes géants [15]. Chez l'humain, la structure placentaire est plutôt de type hémomonochorial [32]. Une seule couche de cellule appelée syncytiotrophoblaste, sépare la circulation maternelle de la circulation fœtale [33].

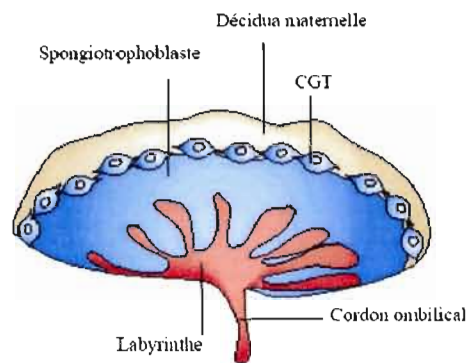


Figure 1.1 Le placenta trichorial de la souris. Trois couches de cellules composent le placenta trichorial : les cellules du labyrinthe, les spongiotrophoblastes et les trophoblastes géants. Tirée et modifiée de Rossant et Cross, 2001 [28].

Le type de placentation hémochorial est le type le plus invasif. Les cellules du trophoblaste creusent leur chemin à travers la membrane utérine maternelle jusqu'à la circulation sanguine [34].

Autant chez la souris que chez l'humain, un placenta complètement développé est morphologiquement constitué de trois principales couches cellulaires. La première est la couche externe, qui renferme les cellules décidues de l'utérus. Cette couche représente également la vascularisation maternelle apportant le sang au site d'implantation. La seconde couche, dite région intermédiaire de jonction, assure l'attachement du placenta à l'utérus. Elle est constituée de cellules trophoblastiques qui envahissent les murs de l'utérus et les vaisseaux maternels. La troisième couche ou couche interne, se compose de villosités conçues pour assurer les échanges entre la mère et son fœtus. Composées de cellules épithéliales externes provenant de cellules du trophoblaste et de cellules stromales, les villosités baignent dans le sang maternel [28].

1.1.2 De la fécondation au vingt-et-unième jour

En 1994, James C Cross et ses collaborateurs ont résumé le développement embryonnaire chez la souris en sept étapes résumées dans la figure 1.2.

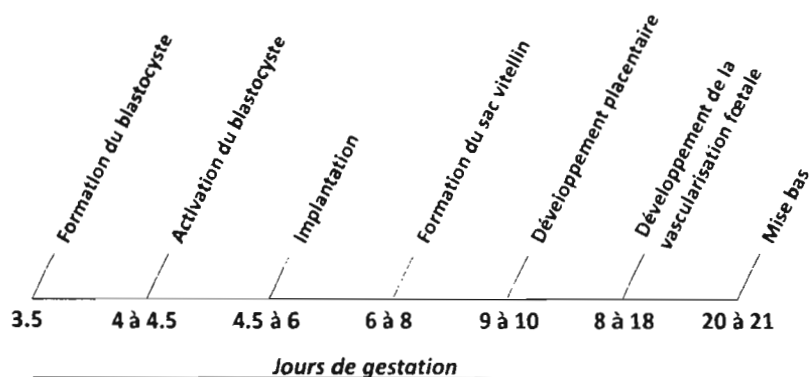


Figure 1.2 Étapes du développement embryonnaire chez la souris.

Ainsi, la première étape suivant la fécondation est la formation de la morula. L'embryon pénètre la lumière de l'utérus pour se transformer en blastocyste. Ce même blastocyste est composé de deux populations cellulaires, la masse cellulaire interne et le trophoblaste. La masse cellulaire interne, totalement indifférenciée, deviendra l'embryon et le trophoblaste le précurseur des trophoblastes. Comme schématisé dans la figure 1.3 ci-dessous, avant de s'implanter, le blastocyste s'active et se différencie en épiblaste et en endoderme primitif [35].

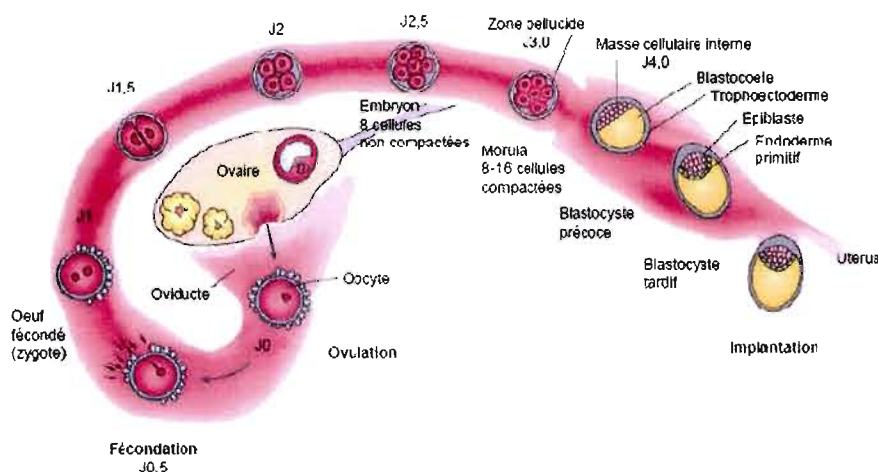


Figure 1.3 Développement embryonnaire et implantation chez la souris. Cette figure résume les principales étapes du développement de l'embryon débutant par la fécondation (jour 0.5) allant jusqu'au début de l'implantation. Tirée et modifiée de Wang, Xie, Dey, 2006 [35].

L'implantation utérine se produit au quatrième jour de la gestation lorsque le blastocyste se fixe à la paroi utérine. C'est à partir de ce moment que débutent les interactions entre la mère et son fœtus. D'une durée de 24h, l'implantation se déroule en trois phases successives : l'apposition, l'adhérence et l'invasion [36]. Il est intéressant de mentionner que la femelle souris, contrairement à la femme, ne peut développer une grossesse extra-utérine [37].

La phase de l'apposition représente celle où le blastocyste entre en contact avec le tissu maternel. L'embryon adhère ensuite à la paroi utérine pour s'y ancrer (phase d'adhérence). Les cellules adjacentes au site d'implantation prolifèrent et se différencient pour faire apparaître une nouvelle structure, la décidua [38]. Le déclenchement et le temps alloué à la décidualisation n'est pas le même chez la souris et l'humain. Chez la souris, la décidualisation est induite par l'implantation embryonnaire contrairement à l'apparition de la décidualisation au vingt-troisième jour du cycle menstruel chez la femme [39]. La décidua agit comme une barrière protectrice mais permet également à l'embryon de

s'approvisionner en nutriments. Finalement, au cours de la phase de l'invasion, le tissu maternel est pénétré par les trophoblastes [40]. C'est le début de la formation du placenta.

Au quatrième jour, la placentation débute et le trophoctoderme se différencie. Les cellules trophoblastiques polaires apparaissent et donneront naissance à l'ectoderme extraembryonnaire et au cône ectoplacentaire. Chez la souris l'ectoderme extraembryonnaire deviendra éventuellement le labyrinthe. Le trophoctoderme se différencie par le fait même en cellules trophoblastiques murales qui formeront les cellules géantes primaires du trophoblaste et ce, par endoréplication (Figure 1.4). Ces cellules géantes ont pour homologues les cytotrophoblastes extravilloux chez l'humain [28].

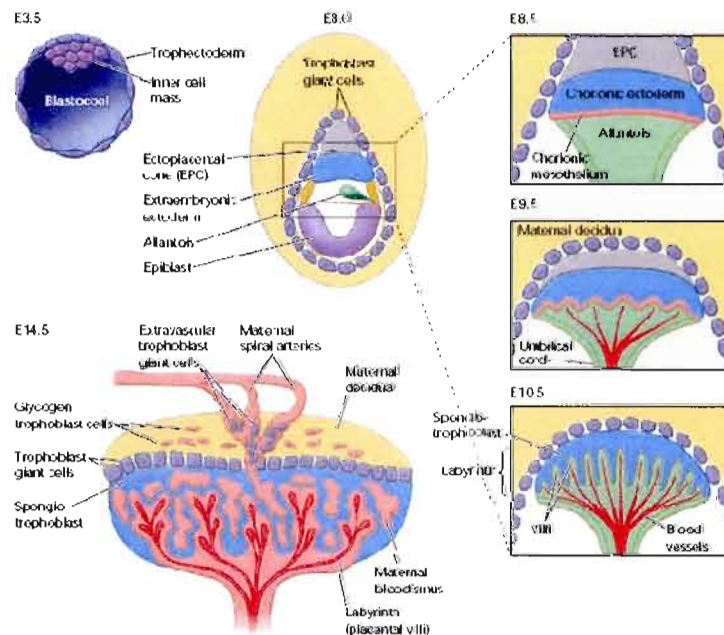


Figure 1.4 Développement des structures formant le placenta de la souris [30]. Il est possible de remarquer sur cette figure l'apparition de l'ectoderme extraembryonnaire, du cône ectoplacentaire et des cellules géantes du trophoblaste suite à la différenciation du trophoctoderme.

Au cinquième jour et demi, le stade d'« œuf cylindrique » est atteint. Au même moment se différencie l'endoderme à même la masse interne de l'embryon. Il y a ensuite formation de la membrane de Reichert suite à la migration des cellules de l'endoderme pariétal vers la surface basale de la couche de trophoblastes. Un système d'échange temporaire est ainsi établi entre l'embryon et la circulation maternelle [40]. Ce système d'échange transitoire sera fonctionnel jusqu'au huitième jour où le placenta sera complètement formé et où le véritable système d'échange mère-enfant sera établi.

La première structure placentaire à apparaître est le sac vitellin pariétal. L'absorption des nutriments provenant de la mère est rendue possible grâce cette structure. L'absorption est réalisée via les capillaires situés dans la décidua à la jonction des cellules géantes et la membrane de Reichert (Figure 1.5) [41].

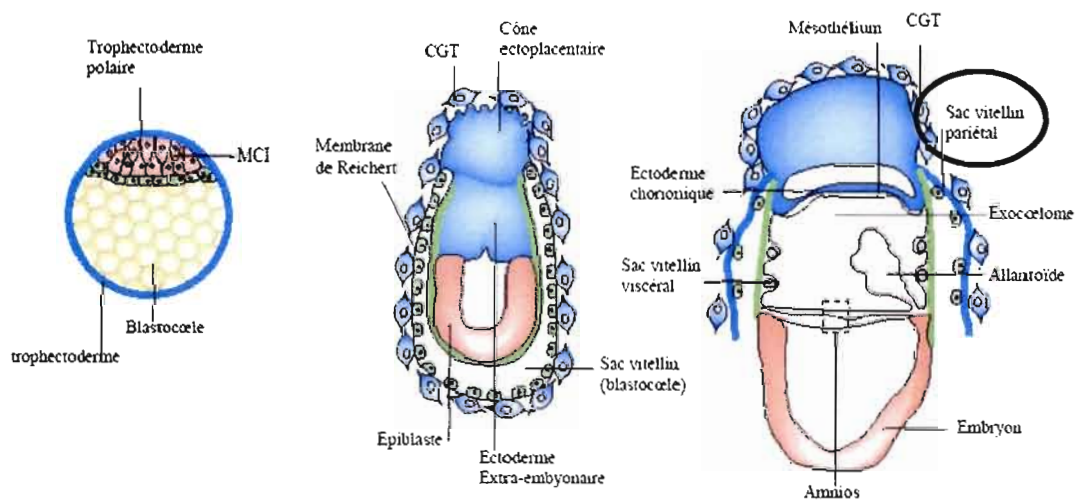


Figure 1.5 Développement des structures formant le placenta de la souris. Une fois le huitième jour atteint, le placenta est complètement formé. La première structure placentaire à apparaître est le sac vitellin pariétal. Tirée et modifiée de Rossant et Cross, 2001 [28].

Au cours de la huitième journée, les cellules du mésoderme migrent à la surface interne de l'endoderme viscéral. Le placenta commence à se vasculariser. Cette portion vascularisée

du placenta, appelée l'allantois, fusionnera avec le chorion pour éventuellement former les villosités et les vaisseaux sanguins [30]. Les trophoblastes chorioniques et les vaisseaux fœtaux avoisinants établiront un réseau sanguin pour le fœtus dans une zone appelée le labyrinthe. À partir de ce moment, les cellules chorioniques du trophoblaste se différencient en 2 types de cellules labyrinthiques : une bicouche de syncytiotrophoblastes et les cytotrophoblastes. Multinucléés, les syncytiotrophoblastes proviennent de la fusion des trophoblastes et entourent les capillaires fœtaux. Mononucléés, les cytotrophoblastes couvrent les sinus sanguins maternels [41]. Ce type de développement placentaire est décrit comme une placentation hémotrichoriale.

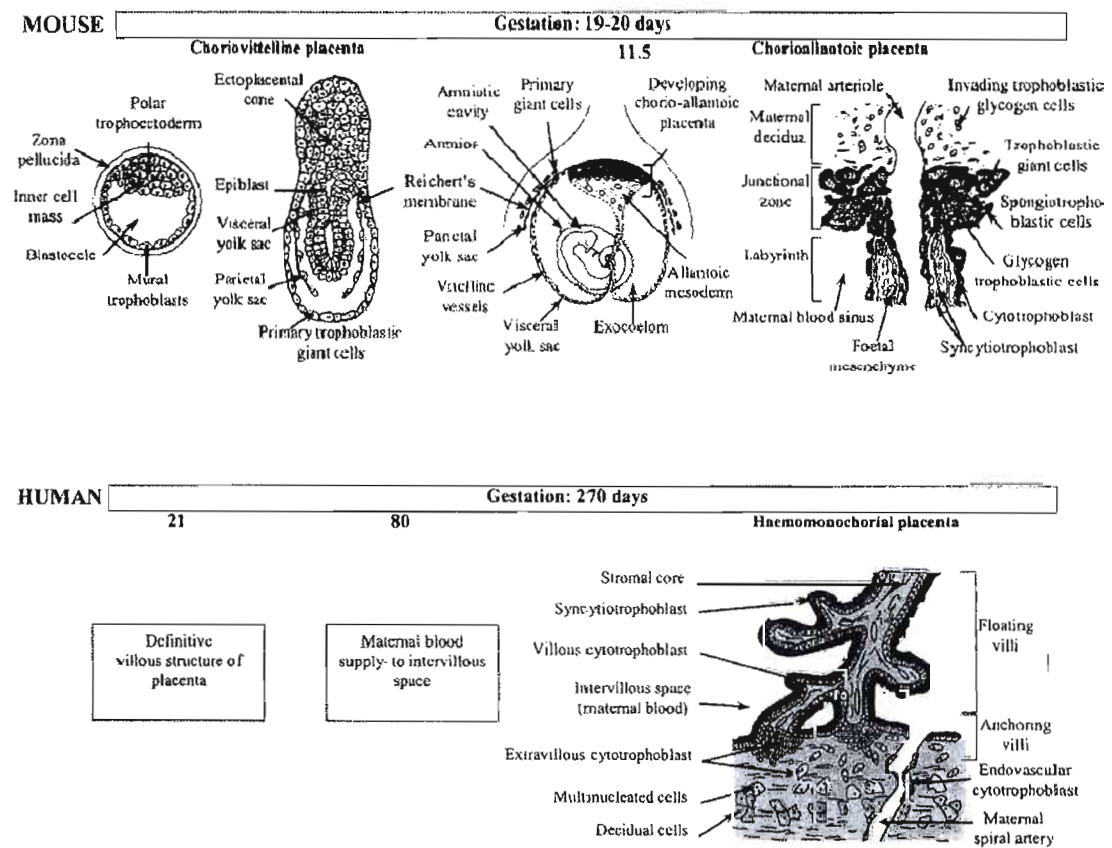


Figure 1.6 Comparaison entre le développement évolutif du placenta de souris et celui de l'humain [42]. Description des différents types cellulaires composant le placenta de souris au cours des 20 jours de gestation et du placenta humain au cours des 270 jours de grossesse.

À mesure qu'il se développe, le labyrinthe peut compter sur le support structural des spongiotrophoblastes (Figure 1.7). Cette couche de cellule non syncytiale est originaire du cône ectoplacentaire et se situe entre le labyrinthe et les cellules géantes. Les spongiotrophoblastes sont associés aux colonnes cytotrophoblastiques chez l'humain [28]. Une fois différenciés, les spongiotrophoblastes donneront des cellules glyco-géniques responsables de l'invasion de la décidua au treizième jour. Contrairement à l'humain, le processus d'invasion ne se poursuit pas dans le myomètre [39].

Le sang en provenance de la mère traversera les spongiotrophoblastes en passant par les sinus artériels pour ensuite pénétrer dans le labyrinthe où baigne les trophoblastes vilieux et où se produiront les échanges entre les deux systèmes sanguins. Dû à l'arrangement parallèle des capillaires fœtaux, ce système d'échange à contre-courant est caractérisé comme étant plus efficace que celui chez l'humain [32]. Néanmoins, le syncytiotrophoblaste demeure la seule véritable barrière sélective chez l'humain et la souris.

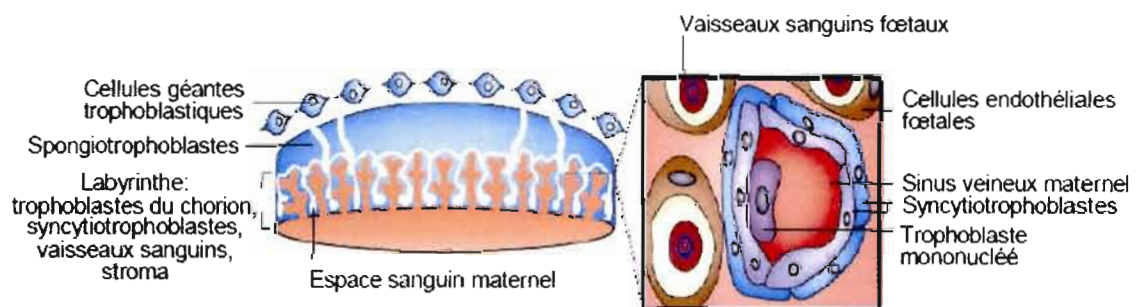


Figure 1.7 Structure du placenta de souris. Situé à l'interstice entre les cellules géantes du trophoblastes et du labyrinthe, les spongiotrophoblastes représentent la matrice par laquelle traverse le sang maternel. Tirée et modifiée de Rossant et Cross, 2001 [28].

1.1.3 L'embryon de souris

Au huitième jour apparaît les premières structures embryonnaires, les somites. Les somites sont des segments mésodermiques du corps de l'embryon qui participeront à la formation des muscles, des os et de la peau. Au jour 8.5, l'embryon se replie sur lui-même et les organes commencent à se former (ex : foie, thyroïde). Au neuvième jour, il y a apparition des poumons et du tube neural. Ce même tube neural se fermera ultérieurement au niveau du cerveau au stade 15-19 somites. Suivra l'apparition des membres inférieurs et supérieurs et le cœur débutera son fonctionnement. Jusqu'à la mise bas, les différents tissus et organes continueront à se développer [43].

1.2 LE CALCIUM

1.2.1 Les différentes formes de calcium

Le calcium est un élément vital pour plusieurs processus biologiques tels la minéralisation du squelette, la formation des os et de multiples fonctions cellulaires [2]. La présence d'une concentration appropriée de calcium dans l'environnement fœtal est primordiale pour le développement du fœtus [5, 6]. En effet, le calcium est l'un des cations les plus abondants du corps humain [44]. Il est essentiel à la minéralisation et au développement des os mais il assure également une croissance adéquate du fœtus [45]. Des preuves convaincantes suggèrent que la programmation fœtale contribue au risque de développer de l'ostéoporose [46]. La programmation fœtale est l'hypothèse selon laquelle la nutrition maternelle et fœtale peut avoir un effet profond qui dure toute la vie sur la santé de l'enfant à l'âge adulte [47-49].

Le calcium peut être retrouvé sous différentes formes dans la circulation sanguine. Il peut être lié à des protéines, par exemple à l'albumine et/ou à des globulines, et représente 40%

du calcium total. À un plus faible pourcentage (environ 10%), le calcium peut se complexer à divers composés tels : des bicarbonates, des phosphates et citrates. Le type de calcium le plus abondant est celui sous forme ionisée [50]. Représentant 50% du calcium total, le calcium ionisé se retrouve sous une forme libre, une forme métaboliquement active [51]. Le calcium ionisé est ainsi impliqué dans de multiples réactions enzymatiques et mécanismes de transport membranaire. Ce calcium joue également un rôle capital au niveau de la coagulation sanguine, de la conduction nerveuse, de la transmission neuromusculaire et de la contraction musculaire. Le calcium ionisé agit également comme messenger intracellulaire assurant la sécrétion d'enzymes et d'hormones [50]. Un grand intérêt est donc porté à la quantification de cette forme de calcium. Toutefois, l'analyse expérimentale de ce composé organique demande beaucoup de précautions. La forme active peut rapidement être altérée par plusieurs facteurs tels l'air et la température. En effet, l'exposition d'un échantillon sanguin à l'air libre entraînera une augmentation du pH, due à une perte en CO₂, qui par conséquent entraînera une diminution du taux de calcium ionisé. Le dosage du calcium est réalisé par potentiométrie avec des électrodes à ions sélectifs [52]. Il existe actuellement des appareils hautement sophistiqués permettant l'analyse de ce calcium (ex : le Stat Profile Critical Care Express (CCX) de Nova Biomedical). Un appareil de ce genre demande toutefois l'utilisation de capillaires à héparine balancés.

1.2.2 Source de calcium pour le fœtus

Comme il a été mentionné précédemment, le calcium représente un des éléments les plus abondants du corps humain [44]. Il est le principal constituant des dents et des os et est retrouvé à des niveaux plus ou moins variables dans le sang et fluides extracellulaires [50, 53]. L'alimentation est la seule véritable façon de s'approvisionner en calcium. De ce fait, la mère représente la source unique de calcium pour son fœtus. Il a été démontré qu'une carence en calcium, dans la diète maternelle, durant la croissance du fœtus était associée à une diminution de la masse osseuse chez l'enfant. De plus, un apport inadéquat en calcium chez le fœtus entraîne un retard de croissance et à plus long terme, à l'âge adulte de

l'ostéoporose. Par conséquent, un transfert adéquat de calcium par le placenta est vital pour le développement du fœtus [53, 54].

1.2.3 Équilibre calcique maternel durant la grossesse

En situation normale, la mère est hypocalcémique par rapport à son fœtus. Le gradient calcique établi entre ceux-ci permet de maintenir un niveau de calcium plus élevé dans la circulation fœtale tout au long de la grossesse. La concentration en calcium est plus élevée dans le sang fœtal dû à une augmentation de la forme ionisée [55, 56]. Ce transfert de calcium via la barrière placentaire est maintenu principalement par une hormone, la PTHrP « parathyroid hormone related-peptide » [57, 58].

Chez l'humain, un fœtus à terme aura accumulé de 25 à 30 g de calcium au cours de son développement. Le dernier tiers de la grossesse représente une étape importante pour le transfert de calcium et correspond à la période où la minéralisation du squelette se produit. En effet, 80% du calcium est transféré durant le dernier tiers jusqu'à concurrence de 200 mg/jour [8]. Chez la souris, le dernier tiers correspond aux 5 derniers jours de la gestation. Durant cette période, la femelle transférera environ 12 mg de calcium à son fœtus [10].

Afin de maintenir un apport suffisant de calcium pour son fœtus, le métabolisme de la mère doit s'adapter. Le taux d'absorption intestinale double, le niveau d'excrétion rénale diminue et la résorption osseuse augmente [59]. Lors d'une situation d'hypocalcémie, la vitamine D₃, sous le contrôle de la PTH « parathyroid hormone », est responsable de rétablir l'équilibre calcique [60, 61]. La vitamine D₃ est d'abord hydroxylé en 25-(OH)D₃ dans le foie. Elle est hydroxylée une seconde fois par la [25-(OH)D₃-1 α -(OH)ase] au niveau des reins pour générer la forme active, la 1,25-(OH)₂D₃. La forme active de la vitamine D₃ agit au niveau des reins afin d'augmenter l'absorption en calcium par ceux-ci [62]. Ainsi, afin de maintenir un niveau adéquat de calcium dans le sang de la mère, le niveau de vitamine D₃ demeure élevé tout au long de la grossesse. Lorsque le niveau de calcium devient trop élevé dans le sang maternel,

l'homéostasie du calcium est rétablie grâce à la calcitonine [63]. La présence de cette hormone entraîne la diminution de l'activité de la vitamine D ayant pour effet de minimiser l'absorption du calcium par le duodénum. La calcitonine peut également agir sur les ostéoblastes d'une telle manière à stopper la résorption osseuse. De plus, la calcitonine favorise la libération du calcium par les reins [50]. Comme il a été mentionné précédemment, l'hormone parathyroïdienne (PTH) est impliquée dans le maintien de l'équilibre calcique. Toutefois, chez la femme enceinte, le niveau de PTH reste constant tout au long de la grossesse et ce, malgré la variation du taux de calcium [64]. La PTHrP serait responsable d'assurer le maintien d'un gradient adéquat de calcium entre la mère et son fœtus [65].

1.3 Le peptide apparenté à la parathormone (PTHrP)

1.3.1 Généralités

La PTHrP a été découverte en 1987 comme étant le principal facteur tumoral responsable du syndrome paranéoplasique d'hypercalcémie humoral maligne (HHM) [66]. Elle est sécrétée par plusieurs néoplasmes et cause cette hypercalcémie maligne en mimant l'action de la PTH [67]. La PTHrP joue un rôle important dans le développement du squelette, dans la différenciation des cellules osseuses [68] en plus de jouer un rôle important dans le développement embryonnaire [69]. La PTHrP est une hormone oncofœtale produite tout au long du développement fœtal par les glandes parathyroïdes, le syncytiotrophoblaste, l'amnion, le chorion et le cordon ombilical [11]. Retrouvée en grande partie dans le liquide amniotique, la PTHrP stimule la différenciation cellulaire ainsi que le transfert de calcium [25]. L'activation de la PTHrP enclenche diverses voies de signalisation parallèles dont celle de l'adénylate cyclase (AC) et de la phospholipase C (PLC) [70].

1.3.2 Le peptide apparenté à la parathormone (PTHrP): différent de la parathormone (PTH)

Il est important de ne pas confondre la PTHrP avec la PTH. Le gène de la PTHrP se retrouve au niveau du chromosome 12 et celui de la PTH sur le chromosome 11 [71]. La parathormone est une hormone synthétisée presque exclusivement par les glandes parathyroïdes et assure le maintien de l'équilibre phosphocalcique ainsi que celui du métabolisme osseux [72]. Il a été démontré que la PTH pouvait être sécrétée occasionnellement par le thymus en cas d'urgence lors d'une défaillance des glandes parathyroïdes [73]. Agissant de manière endocrine, la PTH est sécrétée dans le sang lorsque les niveaux de calcium sanguin sont faibles [74]. Une fois relâchée dans la circulation sanguine, la PTH se lie à son récepteur, le PTH1R, entraînant une diminution de l'excrétion rénale, une augmentation de l'absorption de calcium par le tractus gastrointestinal et une augmentation de la résorption osseuse. La sécrétion de PTH en cas d'hypocalcémie favorise la synthèse de la vitamine D₃ qui agit sur les reins afin d'augmenter l'absorption de calcium [75]. La synthèse et la sécrétion de la PTH sont sous le contrôle du récepteur de calcium, le « Calcium-sensing receptor » (CaSR) situé dans les glandes parathyroïdes [76]. Grâce à ce récepteur, le métabolisme peut s'ajuster en quelques minutes aux variations de calcium extracellulaire et de cette façon, libérer des concentrations adéquates de PTH [77]. Il a été démontré que la présence de la PTH ne serait pas nécessaire au développement normale du squelette ni au maintien de l'équilibre calcique chez le fœtus [46].

La PTHrP, quant à elle, est synthétisée par plusieurs tissus fœtaux et adultes et peut agir de manières autocrine/paracrine, endocrine et même intracrine [78, 79]. Ubiquitaire, la PTHrP peut être sécrétée autant de manière constitutive que suite à une réponse à un stimulus nerveux ou hormonal [80]. Ses rôles physiologiques diffèrent de ceux de la PTH. La PTHrP agit autant au niveau de la prolifération et de la différenciation cellulaire qu'au niveau de la relaxation des muscles lisses [81]. Une récente étude a démontré que la PTHrP jouait un rôle dans la régulation du remodelage de l'os chez l'adulte [82]. Malgré leurs rôles distincts,

la PTHrP et la PTH se lient au même récepteur, le «parathyroid hormone 1 receptor» (PTH1R) [83].

Dans ce travail, les résultats ont été générés dans le but de montrer l'implication de la PTHrP dans les échanges transplacentaires de calcium. Dans cette prochaine section seront décrits les différents rôles de la PTHrP et de son implication dans l'homéostasie du calcium.

1.3.3 Structure et fonctions du peptide apparenté à la parathormone

D'après leur structure génomique, le niveau de complexité de la PTHrP est supérieur à celui de la PTH. La PTHrP est issue d'un gène unique retrouvé chez plusieurs espèces animales dont l'homme, la souris, le rat, le chien, le lapin et le bovin [81]. Le gène humain de la PTHrP est constitué de 9 exons donnant, suite à de l'épissage alternatif, trois isoformes de longueurs variables sous le contrôle de promoteurs différents (P1, P2, P3) [84]. L'expression de cette protéine est régulée par plusieurs hormones et facteurs de croissance [85].

Chez l'humain, les trois isoformes générés sont constitués respectivement de 139, 141 et 173 acides aminés. La figure 1.8 ci-dessous montre que le peptide apparenté à la parathormone est constitué d'une séquence unique de 141 acides aminés pour le rat et de 139 acides aminés pour la souris. La taille du gène de la PTHrP fait 15 kpb [85]. Les promoteurs ont des boîtes TATA et une séquence riche en GC. Les séquences TATA sont nécessaires à l'initiation de la transcription [86] tandis que le promoteur contenant les séquences en GC contient de multiples sites de liaison pour des facteurs de transcription [87]. La présence de ces séquences dans les régions promotrices porte à croire que la régulation du gène de la PTHrP s'avère très complexe. Il a été également démontré que la PTHrP est une hormone pouvant être impliquée dans des processus de différenciation et de prolifération cellulaire [88].

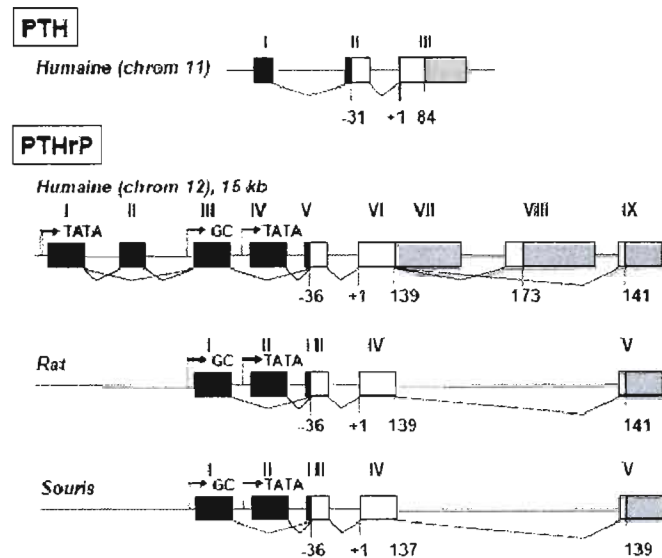


Figure 1.8 Comparaison de la structure du gène de la PTHrP à celle de la PTH [85]. Il est montré dans cette figure la structure du gène de la PTHrP exprimée chez l'humain, la souris et le rat. Chez l'humain, il est possible de remarquer les 3 différents isoformes protéiques de 139, 141 et 173 acides aminés obtenus suite à de l'épissage alternatif. Le gène de la PTHrP donne naissance à une seule protéine de 141 acides aminés pour le rat et de 139 acides aminés pour la souris. La structure beaucoup moins complexe de la PTH, constituée de 84 acides aminés, est également montrée.

La PTHrP possède 62% d'homologie avec la PTH. On retrouve les séquences similaires de ces deux protéines au niveau de la région N-terminale. En effet, huit des treize premiers acides aminés de cette région sont identiques. Malgré le fait qu'après le treizième acide aminé la séquence se voit complètement changée, la structure tridimensionnelle reste semblable jusqu'au 34^{ème} acide aminé. La liaison de la PTHrP et de la PTH au même récepteur, le PTH1R, est due à cette ressemblance structurale dans la région N-terminale. La séquence d'acides aminés dans la région C-terminale de la protéine (111-139) est peu variable d'une espèce à l'autre. Les acides aminés 141 à 173 de la région C-terminale sont spécifiques à l'homme [81]. La PTHrP se compose donc de trois fragments : le fragment N-terminale (1-36), le fragment intermédiaire (38-94) et le fragment C-terminal (107-139). Comme il a été mentionné précédemment, le fragment initial de la protéine (1-36) est celui responsable de lier le récepteur (PTH1R) [81]. L'équilibre phosphocalcique est en outre maintenu

indirectement par l'activation de ce récepteur [72]. De plus, il a été démontré que le fragment N-terminal est impliqué dans le processus de prolifération cellulaire de cellules normales et tumorales mais également au niveau des cellules trophoblastiques [85].

La forme mature, le fragment intermédiaire (38-94), joue un rôle important dans le transport de calcium par le placenta [85]. Bond *et al* [69] ont démontré que la PTHrP pouvait faire varier l'expression de certains transporteurs (ex : CaBP-9K) de calcium et ainsi assurer le maintien du gradient calcique entre la mère et son fœtus. Ce fragment est aussi susceptible de subir l'action de prohormones convertases dû à la présence de sites multibasiques [81]. Les sites multibasiques sont constitués d'acides aminés basiques et représentent des sites potentiels de clivages par des prohormones convertases [89].

De son côté, le fragment C-terminal (107-139) a comme principale fonction d'inhiber la résorption osseuse. Cette portion de la PTHrP a pour effet d'activer les ostéoblastes et d'inhiber l'action des ostéoclastes [90]. De la même façon que le fragment N-terminal, le fragment C-terminal est aussi impliqué dans le processus de prolifération cellulaire de cellules normales et tumorales [91]. Suite à l'épissage alternatif de l'exon six, le fragment (141-173) de la PTHrP est produit. Le rôle exact de ce fragment est encore indéterminé, mais il est connu toutefois que sa spécificité est unique à l'humain. Goomer *et al.* ont montré que la PTHrP (141-173) était impliquée dans la synthèse matricielle et le métabolisme des pyrophosphates inorganiques dans les chondrocytes [92].

Chez la souris, le haut niveau d'expression d'ARNm de PTHrP durant l'embryogenèse des tissus embryonnaires et extraembryonnaires suggère qu'elle serait impliquée dans de multiples processus de croissance et de différenciation cellulaire [27]. De plus, les résultats générés par ce projet de recherche ont confirmé que la présence de la PTHrP était indispensable à la survie du fœtus. Les différents résultats obtenus montrent également que la PTHrP et le récepteur PTH1R sont impliqués dans la régulation du transport de calcium par le placenta.

1.3.4 Le récepteur du peptide apparenté à la parathormone (PTH1R)

La région N-Terminale de la PTHrP est responsable d'activer le récepteur PTH1R et ainsi mimer l'action de la PTH. La PTHrP peut aussi lier son récepteur indépendamment de la PTH, sans mimer l'effet de celle-ci [81]. On retrouve le PTH1R dans pratiquement tous tissus. Bien sur, une plus forte expression du récepteur est mesurée dans les tissus où la PTH et la PTHrP sont grandement suscitées (ex : les reins, les os) [93]. Dans le cas présent, la liaison de la PTHrP à son récepteur stimule la résorption osseuse ainsi que la réabsorption du calcium par les reins [94]. En plus d'être retrouvé dans la membrane, le PTH1R est également situé au niveau du noyau (ex : cellules épithéliales glandulaires (utérus)) [95]. Le gène du récepteur PTH1R se compose de 17 exons et se retrouve au niveau du bras court du troisième chromosome. D'une taille de 22 kpb d'ADN génomique, ce gène est plus précisément constitué de 14 exons codants et de 3 exons non-codants.

Il existe un second récepteur, le PTH2R, qui lui ne peut lier la PTHrP mais uniquement la PTH [96]. Rubin *et al* ont démontré dernièrement l'existence d'un troisième récepteur chez le poisson zèbre, le PTH3R. Ce récepteur est capable de lier la PTHrP et avec beaucoup moins d'affinité, la PTH. Ce récepteur serait spécifique aux poissons puisque son expression n'a pas été retrouvée chez l'humain [97].

Le PTH1R est un récepteur à protéine G appartenant à la famille B (ou famille 2) appelé « secretin-receptor family ». Cette famille de récepteur à 7 domaines transmembranaires est caractérisée par la présence d'un domaine extracellulaire d'environ 160 acides aminés contenant 6 résidus cystéines (résidus conservés) et plus de 4 sites de glycosylation. Lié à la sous-unité hétérotrimérique G_{α} , le récepteur à la PTHrP interagit avec plusieurs effecteurs (Figure 1.9). Le récepteur PTH1R peut activer l'adénylate cyclase (AC) via la sous-unité G_{α_s} et la phospholipase C_{β} (PLC_{β}) via la sous-unité $G_{\alpha_q/11}$. Une fois activée, l'adénylate cyclase (AC) stimule la formation d'AMPc qui à son tour active la protéine kinase A (PKA). De son côté, la phospholipase C engendre la formation de diacylglycérol (DAG) et de 1,4,5-inositol

triphosphate (IP3). L'activation du diacylglycérol a pour effet de stimuler la protéine kinase C (PKC) et de provoquer une augmentation du calcium intracellulaire libre (Ca^{2+}) via l'IP3. Un influx de calcium extracellulaire peut également être engendré par l'activation du récepteur PTH1R en agissant sur certains canaux calciques [98].

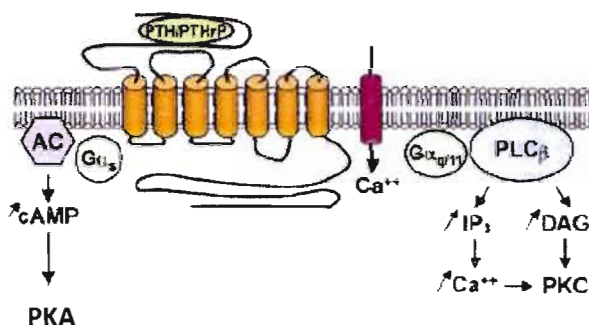


Figure 1.9 Les effecteurs situés en aval du récepteur à la PTHrP [98]. Lors de la liaison de la PTHrP sur son récepteur le PTH1R, 2 voies de signalisation peuvent être activées : l'adénylate cyclase et la phospholipase C.

Dépendamment du tissu ou du type cellulaire, la PTHrP peut préférer une voie d'activation plus que l'autre. La voie de l'AC serait davantage utilisée par le récepteur et la réponse induite serait d'autant plus intense que lors de l'activation de la voie de la PLC [93].

Une autre voie de régulation est celle de la désensibilisation et de l'internalisation du récepteur PTH1R (Figure 1.10). Ce mécanisme d'action a pour effet de stopper momentanément l'action du récepteur en l'internalisant, dans le but d'interrompre la réponse cellulaire. Le PTH1R est d'abord activé par la liaison d'un agoniste sur celui-ci, puis ensuite phosphorylé au niveau de l'extrémité C-terminale par des protéines kinases (ex : protéine kinase associée au récepteur à protéine G (GRK), PKA). L'affinité pour la β -arrestine s'accroît et celle-ci se lie au récepteur. Cette liaison de la β -arrestine provoque le découplage du récepteur et entraîne le complexe ligand-récepteur vers la voie de l'internalisation. L'agoniste se dissocie du récepteur pour que le PTH1R subisse une

déphosphorylation suite à une diminution du pH dans l'endosome. Le récepteur peut ensuite être recyclé et redirigé vers la membrane (pour à nouveau jouer le rôle de récepteur) ou bien être dégradé [99]. (Voir figure ci-dessous)

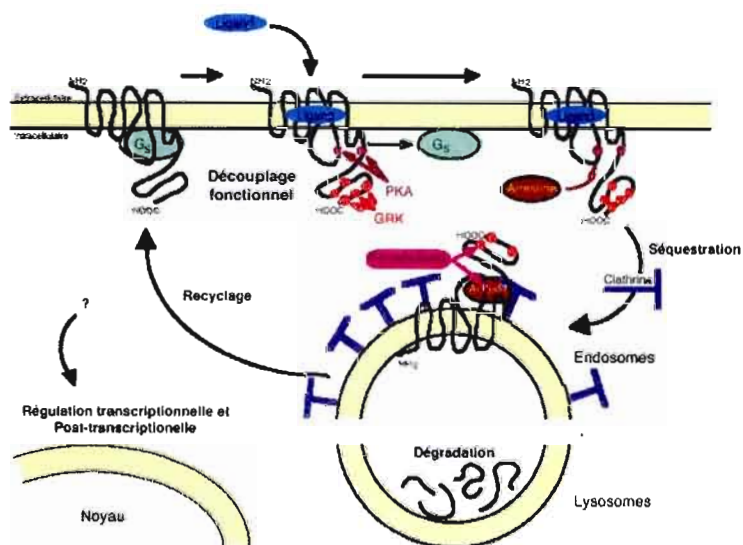


Figure 1.10 Internalisation du récepteur PTH1R. Le ligand se lie au récepteur et subi une phosphorylation. La β -arrestine est recrutée par le récepteur et engendre son découplage. Le découplage provoque l'internalisation du complexe ligand-récepteur. Tiré du site personnel du Dr Stéphane Le Crom (<http://slecrom.free.fr>).

La présence du récepteur à la PTHrP est essentielle au bon développement des os mais également à la survie du fœtus. Le modèle murin, knockout (KO) en PTH1R (PTH1R^{-/-}), utilisé dans la présente étude démontre, et a été démontré par l'équipe du Dr Kronenberg de l'Université Harvard, qu'une souris déficiente en PTH1R ne peut survivre et mourra avant ou dès sa naissance [84]. De plus, des maladies telles la chondrodysplasie de Jansen et la chondrodysplasie de Blomstrand ont été répertoriées et associées à des mutations du gène PTH1R. La chondrodysplasie de Jansen est décrite comme étant un désordre autosomique dominant entraînant la réduction des membres associé à une hypercalcémie et une hypophosphatémie [100]. De son côté, la chondrodysplasie de Blomstrand, également une maladie autosomique dite récessive, entraîne la mort des chondrocytes dans les derniers

mois de la grossesse. Les os longs sont courts et possèdent une plus forte densité. Une absence de plaque de croissance est également observée [101].

1.4 Les pompes à calcium PMCA 1 et PMCA 4 « plasma membrane Ca^{2+} -ATPase »

Les PMCA ou « plasma membrane calcium ATPase » sont des pompes à calcium jouant un rôle important dans le maintien du niveau de calcium intracellulaire. Les PMCA sont codées par quatre gènes indépendants et sont exprimées chez toutes les cellules animales [102]. La PMCA 1 et la PMCA 4 sont ubiquitaires alors que les PMCA 2 et PMCA 3 sont retrouvées dans des tissus plus spécifiques [103]. Le phénomène d'épissage alternatif génère plus d'une vingtaine d'isoformes différents de PMCA. Ils font tous partie de la famille des « P-type primary ion transport ATPases » [104].

Les PMCA ont été découvertes pour la première fois en 1960 dans la membrane de globules rouges où elles agissaient solitairement en tant qu'exportateur de calcium [104, 105]. Les PMCA ont pour principale fonction de pomper les ions calciques (Ca^{2+}) du cytoplasme vers le milieu extracellulaire [106]. Cette extrusion de calcium nécessite un coût énergétique. En effet, pour expulser un ion de calcium du cytosol vers le milieu extracellulaire, la pompe doit utiliser une molécule d'ATP [107]. Les PMCA s'assurent donc de maintenir un niveau adéquat de calcium (concentration en nano molaire) dans la cellule pour éviter toute accumulation qui pourrait devenir létale [104, 108].

Les PMCA sont localisées au niveau de la membrane plasmique et sont constituées de 10 domaines transmembranaires [109]. La pompe se divise en trois parties : la boucle intracellulaire, la grosse unité et la queue. La boucle intracellulaire représente le domaine de transduction. Cette région de la pompe contient la première boucle cytosolique, responsable de l'autoinhibition de la PMCA, en plus de contenir le site d'épissage A. La boucle intracellulaire contient également des domaines de liaison aux phospholipides. La

grosse unité renferme le site de liaison à l'ATP. C'est le domaine catalytique [109-111]. La portion C-terminale ou queue présente le domaine de liaison à la calmoduline (Figure 1.11) ainsi que plusieurs sites de phosphorylation (ex : pour la PKA et PKC).

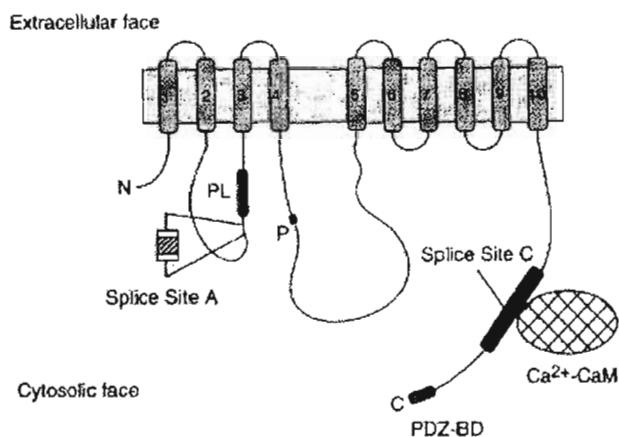


Figure 1.11 Modèle en deux dimensions de PMCA lors d'une stimulation à la Ca²⁺-Calmoduline. Les PMCA sont constitués de dix domaines transmembranaires, un domaine de transduction contenant un site d'épissage et une queue contenant un domaine de liaison à la calmoduline. Cette figure montre la PMCA sous la forme active puisqu'elle est liée à la calmoduline. Tirée et modifiée de Strehler et Zacharias, 2001 [104].

La liaison de la calmoduline [112] au domaine de liaison à la calmoduline active le récepteur [113]. Cette activation engendre une augmentation de l'affinité de la pompe pour le calcium et l'ATP. En l'absence de calmoduline, la PMCA exerce un effet d'autoinhibition (Figure 1.12). Ainsi, le domaine de liaison à la calmoduline obstrue le site de liaison à l'ATP en s'y liant. Cette fonction d'inactivation empêche le récepteur d'être constamment activé par la présence de calcium ou d'ATP [113-116].

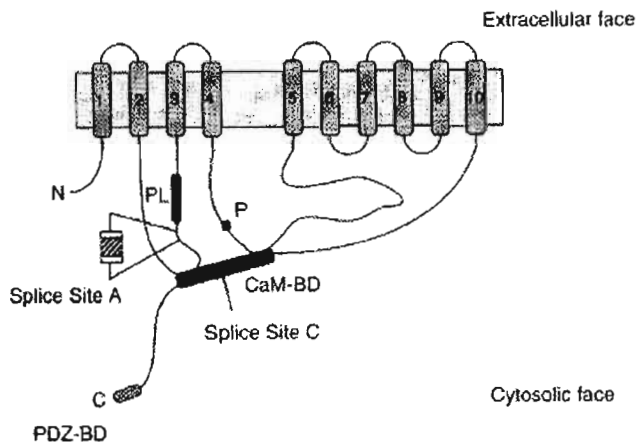


Figure 1.12 Modèle en deux dimensions de PMCA lors d'une autoinhibition. Les PMCA sont constitués de dix domaines transmembranaires, un domaine de transduction contenant un site d'épissage et une queue contenant un domaine de liaison à la calmoduline. Cette figure montre la PMCA sous la forme active puisqu'elle est liée à la calmoduline. Tirée et modifiée de Strehler et Zacharias, 2001 [104].

La PMCA peut également s'autoactiver et ce sans que la calmoduline se lie à son domaine de liaison [117]. D'autres protéines telles les acides phospholipidiques (ex : phosphatidylinositol) et les polyphosphoinositides peuvent également déclencher l'activation de la PMCA [118, 119].

Dans le placenta, on retrouve les PMCA du côté fœtal soit au niveau de la membrane basale du syncytiotrophoblaste. La pompe à calcium est donc responsable d'expulser le calcium cytosolique vers la circulation fœtale [19, 120, 121]. En effet, le D^{re} Julie Lafond et son équipe ont démontré, au début des années 1990, l'implication des PMCA dans le mécanisme d'extrusion du calcium à partir du syncytiotrophoblaste [19].

Les PMCA 1 et PMCA 4 sont les isoformes les plus abondants dans le placenta humain [121, 122]. Au début des années 2000, une équipe de Suède a obtenu des résultats convergeant avec ceux obtenus par Lafond *et al.*, prouvant l'expression des PMCA 1 et PMCA 4 dans le placenta mais également que leur expression n'était pas modulée durant le dernier tiers de

la grossesse [121]. Les PMCA 2 et PMCA 3 y sont également présentes mais beaucoup plus faiblement exprimées [123]. Le dernier tiers de la grossesse correspond à une étape majeure pour le transfert de calcium de la mère vers son fœtus [124]. Les PMCA 1 et PMCA 4 semblent donc être les principales protéines impliquées dans l'extrusion du calcium à partir des syncytiotrophoblastes. Lors de l'usage d'un inhibiteur des PMCA (l'érythrosine B), le transport de calcium s'est vu inhibé montrant ainsi l'importance de ces pompes dans le maintien de l'homéostasie du calcium. Plusieurs modèles animaux ont montré des problèmes mineurs et ou sévères suite à un knockout en PMCA. De plus, lors d'un knockout en PMCA 1, les dommages infligés à l'embryon sont létaux [125-127]. De leur côté, les PMCA 2 et PMCA 3 seraient davantage impliquées dans les processus de développement et de différenciation cellulaire [123]. Finalement, Strid *et al.* (2002) ont montré que le fragment intermédiaire (38-94) de la PTHrP engendrait indirectement la stimulation des PMCA avec un effet dose-dépendent et que le fragment (1-34) de la PTHrP régulait positivement les PMCA à des concentrations supraphysiologiques [128].

1.5 Les canaux TRPV5 et TRPV6, « transient receptor potential vanilloid »

Le TRPV5 et le TRPV6 sont des canaux épithéliaux faisant partie de la famille des « transient receptor » et de la sous-famille des TRPV « transient receptor potential vanilloid ». Ils représentent la principale voie d'intrusion du calcium dans la cellule [129]. Le TRPV5 et TRPV6 ont été originalement clonés à partir d'un rein de lapin et de l'intestin de rat pour être ensuite identifiés chez la souris et l'humain [130, 131]. Les gènes du TRPV5 et du TRPV6 sont constitués de 15 exons. Chez l'humain, ils sont situés sur le chromosome 7q35 et seulement 22 kpb les séparent. Chez la souris, on les retrouve sur le chromosome 6 qui correspond au chromosome 7q33-35 chez l'humain [12]. Les TRPV5 et TRPV6 sont composés d'environ 730 acides aminés et ont un poids moléculaires d'environ 83 KDa. Ils sont constitués de six domaines transmembranaires (Figure 1.13) et contiennent plusieurs sites de phosphorylation (ex : pour PKC, PKA et la « cGMP-dependent kinase »), un site de

glycosylation « N-linked » et cinq séquences répétitives en ankyrine [132]. Le domaine N-terminale contient des séquences répétitives d'ankyrine permettant de réguler les interactions protéine-protéine. La première séquence répétitive en ankyrine est essentielle à la multimérisation du canal [133]. Le TRPV5 et le TRPV6 fonctionnent comme des canaux calciques homo-tétramérique et hétéro-tétramérique. Dépendamment de leur composition, ils démontrent des caractéristiques physiologiques distinctes [134]. Ces deux canaux sont perméables aux cations monovalents et divalents et possèdent une grande sélectivité pour le calcium [135]. Cette éminente sélectivité est due à la présence d'une région caractéristique de ces canaux, le pore. Le pore est une région du canal hautement sélective pour le calcium [136]. Les TRPV5 et TRPV6 sont surnommés les « gatekeepers » du transport transcellulaire de calcium [137].

Le gène TRPV5 est aussi appelé CaT2 pour « calcium transport protein » et le gène TRPV6, CaT1. Le TRPV6 partage 76% d'homologie en acides aminés avec le TRPV5. L'expression de TRPV6 est plus élevée que TRPV5 dans le placenta humain (ratio TRPV6/TRPV5 = 800) [138].

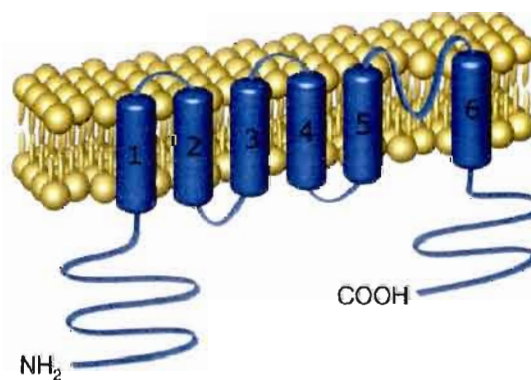


Figure 1.13 Schématisation d'un canal de type TRPV [139]. Cette figure permet de visualiser les six domaines transmembranaires ainsi que les extrémités N- (NH_2) et C- (COOH) terminales constituant les TRPV.

L'expression de TRPV5 et de TRPV6 est sous le contrôle de la vitamine D₃ (1,25(OH)₂D₃). Certaines hormones calcitropiques (ex : vit D₃, œstrogène) ainsi que les niveaux de calcium circulant ont aussi un effet régulateur sur l'expression de ces canaux [140, 141]. Il est connu également que la calmoduline [112], jouant un rôle d'activateur et d'inactivateur de plusieurs canaux ioniques, régule l'activité des TRPV5 et TRPV6. En plus d'influencer leur expression, le calcium intracellulaire influence l'activité des TRPV5 et TRPV6 de la même façon que les protéines kinases (ex : PKC) [142]. Les TRPV5 et TRPV6 sont exprimés dans plusieurs tissus dont les reins, le petit intestin, le placenta, la prostate, les glandes salivaires et même le cerveau [12, 143, 144]. Plus précisément au niveau placentaire, les TRPV5 et TRPV6 sont exprimés dans les cellules syncytiotrophoblastiques du placenta (récemment démontré par un collègue du laboratoire, non publiés).

Il a été démontré que, lors d'une augmentation de l'expression de TRPV6, l'expression des PMCA et de la CaBP-9k est augmentée dans le même sens [145]. De plus, l'expression des ARNm de TRPV5 et TRPV6 augmentent à mesure que la grossesse progresse. Cette augmentation est corrélée avec le transport de calcium par le placenta qui s'accroît dans le dernier tiers de la grossesse [146]. Dans les reins de lapin, le TRPV5 est co-localisé avec plusieurs autres protéines impliquées dans le transport de calcium (ex : CaBP-28k, NCX1, PMCA1) [147]. De la même façon, la co-localisation des ARNm de TRPV5 et de CaBP-28K a été démontrée dans le rein de rat [148]. Ceci porte à croire que l'induction de la synthèse de TRPV5 et TRPV6 pourrait être très importante pour le transport de calcium via les syncytiotrophoblastes.

1.6 Les protéines de liaison au calcium CaBP-9k et CaBP-28k, « calcium-binding protein »

Les CaBP-9k et CaBP-28k appartiennent à la grande famille des « calcium-binding protein » [149]. Elles sont surnommées les « vitamin D-dependent Ca²⁺-binding proteins ». Elles sont exprimées dans de nombreux tissus où l'apport en calcium est éminent comme, les os, les

dents, le cerveau, les reins, les intestins et le placenta. Leur rôle dans ces tissus est indispensable puisqu'ils s'assurent que le passage du calcium dans la cellule s'effectue adéquatement en agissant comme tampon [150]. En effet, il est connu que les CaBPs sont impliquées dans le maintien de l'homéostasie du calcium [16].

Ces régulateurs de calcium ont d'abord été découverts au niveau de l'intestin du cochon [151]. Quelques années plus tard, nombreux sont ceux qui démontrèrent l'expression de ces médiateurs calciques au niveau des tissus mentionnés précédemment. Les CaBPs sont caractérisées par une structure particulière contenant une hélice-boucle-hélice associée au motif « EF-hand » (Figure 1.14) [149]. Les CaBPs sont retrouvées en circulation au niveau cytosolique ou bien ancrées à la membrane faisant face au cytosol [152].

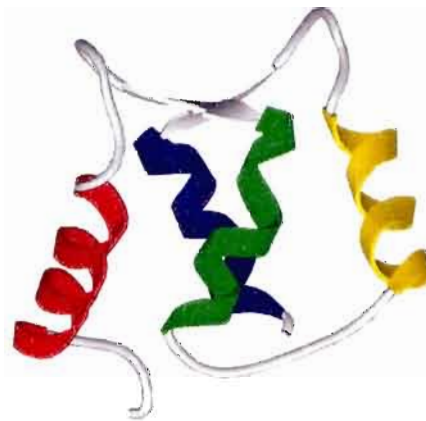


Figure 1.14 Structure tridimensionnelle du motif « EF-hand » des CaBPs. Tiré de « The CaBP Data Library » structbio.vanderbilt.edu/cabp_database/.

Leur expression est sous l'influence de plusieurs hormones stéroïdiennes (par exemple, la vit D₃ [153] et l'estrogène [154]). La PTHrP est également connue pour réguler l'expression des CaBPs [46, 155]. Les CaBPs sont coexprimées avec plusieurs protéines impliquées dans le transport de calcium dont les TRPV5 et TRPV6, le NCX1 et la PMCA1 [150]. Dans un modèle murin où le TRPV5 a été délété, une diminution de l'expression de la CaBP-28K a été

remarquée [132]. En fait, lors de sa translocation à la membrane plasmique, la CaBP-28k interagit directement avec le TRPV5 lors d'une baisse de calcium intracellulaire [150].

Agissant comme tampon, les CaBPs dirigent le calcium intracellulaire vers les TRPV5 et TRPV6 et permettent de maintenir une sortie continue de calcium. Le maintien du flux calcique réussit à contrecarrer le feedback négatif exercé par le calcium libre [140, 143]. Toutefois, il peut arriver que le calcium intracellulaire s'accumule et devient toxique pour la cellule. Les CaBPs prennent en charge le déséquilibre calcique et s'assurent de rétablir l'équilibre [156, 157]. Les CaBPs augmentent le pouvoir diffusionnel du calcium en facilitant son extrusion hors de la cellule (ex : via les PMCA ou les NCX) [158].

La CaBP-9K appartient à la famille S100 des « calcium binding protein ». Les S100 sont en réalité de petites protéines dimériques acides de liaison au calcium et au zinc [159]. La famille des S100 possède deux différents sites de liaison au calcium. Un site de faible affinité, le domaine « EF-hand », et un site de haute affinité, situé dans la région C-terminale [160]. De par sa structure, la CaBP-9k peut donc lier deux ions calciques à la fois. Dépendantes du calcium, les protéines appartenant à la famille S100 peuvent former des homodimères et hétérodimères et parfois même, des oligodimères [161]. Malgré que la CaBP-9K appartienne à la famille S100, celle-ci ne peut former de dimère [162]. La CaBP-9k se présente plutôt sous la forme d'un monomère d'environ 9kDa constitué de soixante-dix-huit acides aminés. On retrouve le gène de la CaBP-9K au niveau du chromosome X [163]. Il existe environ 76% d'homologie en acides aminés entre la CaBP-9K exprimée chez l'humain et la souris [164]. De son côté, la CaBP-28k ou CALB1, contient six domaines « EF-hand » et est capable de lier quatre ions calciques. La CaBP-28k appartient à la superfamille des calmodulines [165]. Ubiquitaires et allostériques, les calmodulines sont des protéines habilitées à lier le calcium libre [166].

Comme il a été mentionné précédemment, les CaBP-9K et CaBP-28k sont exprimées dans plusieurs tissus dont le placenta, plus précisément dans les cellules trophoblastiques chez

l'humain [13, 16, 162, 167]. Au cours du développement fœtal, l'expression des ARNm de la CaBP-9K et de la CaBP-28k s'amplifie à mesure que les besoins en calcium par le fœtus s'accroissent. Les niveaux d'expression des CaBPs augmentent donc durant le dernier tiers de la grossesse, période concomitante avec la forte demande en calcium par les os [13, 16]. Finalement, lors d'un knockout en PTHrP^{-/-} ou PTH1R^{-/-} dans le placenta, il est possible de remarquer une diminution parallèle de l'expression de CABP-9K et du transport du calcium. Ces résultats obtenus prouvent l'importance de la PTHrP dans la régulation des échanges calciques transplacentaire mais prouvent également que le niveau d'expression de la CaBP-9k est dépendant de la PTHrP [15].

1.7 Les échangeurs à sodium-calcium NCX1, NCX2, NCX3, « sodium-calcium exchanger »

Les échangeurs à sodium-calcium ou « sodium-calcium exchanger » (NCX) sont responsables de l'extrusion du calcium intracellulaire. Les NCX font partie d'une superfamille de transporteur les CaCA (Figure 1.15) ou « Ca²⁺ cation antiporter » [168]. Les NCX 1, NCX 2 et NCX 3 appartiennent à la famille des SLC « Solute carrier », plus précisément aux SLC8 [169-171]. Les NCX sont des molécules de faibles affinités à hautes capacités pour le calcium. Les NCX peuvent lier trois ions sodium pour un ion calcium [172]. Il existe trois gènes codant pour les NCX, le NCX1 [169], le NCX2 [170] et le NCX3 [171]. La principale fonction du NCX est d'assurer le maintien d'un niveau de calcium adéquat dans le cytoplasme. L'activation du NCX est dépendante du potentiel membranaire mais également du gradient sodique [173].

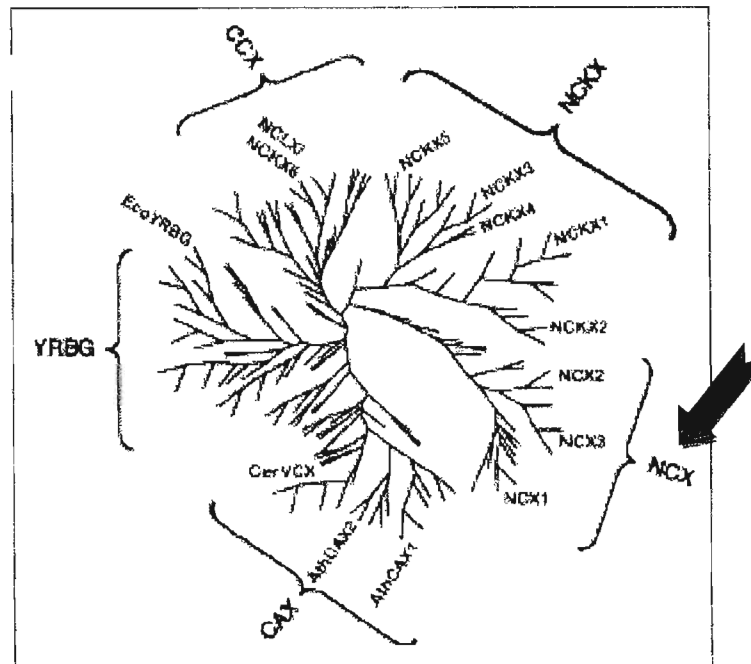


Figure 1.15 La phylogénie des CaCA montrant la famille des NCX [173].

Les trois isoformes du NCX possèdent 70% d'homologie dans leur séquence d'acides aminés. Ceux-ci sont constitués de onze domaines transmembranaires et d'une large boucle hydrophile située entre le cinquième et sixième domaine transmembranaire. Cette boucle, appelée « loop f » contient le domaine de liaison au calcium [169, 174]. Une caractéristique spécifique des NCX, authentique aux CaCA, est la présence d'une séquence conservée d'acides aminés appelée « α repeat region » [175].

L'ADNc du gène NCX 1 contient six exons, fait environ 110 kpb et code pour une protéine de 970 acides aminés [173]. L'épissage alternatif de ces exons génèrent les différents isoformes à tissus spécifiques du NCX [176-178]. Ce qui distingue le plus le NCX 1 des autres NCX est la présence de trente-sept acides aminés absentes chez les NCX 2 et NCX 3 [176]. En plus de posséder un surplus d'acides aminés dans sa boucle intracellulaire, le NCX 1 possède deux séquences répétitives internes appelées « α et β repeats » [171, 176]. La séquence répétitive α , retrouvée chez les trois isoformes du NCX, forme un genre de vestibule nécessaire à la liaison et au transport des ions à travers le transporteur [173]. La séquence

répétitive β , située dans la boucle f, est quant à elle responsable de la liaison au calcium [179]. La principale voie de régulation des NCX est sans aucun doute le calcium intracellulaire [180]. Il est également connu que la PTHrP est capable d'activer le NCX 1 [181].

Conjointement avec les PMCA, les NCX s'assurent de maintenir l'équilibre du calcium intracellulaire [172]. Il a été démontré que les NCX étaient co-localisés avec le TRPV5, la CaBP-28k et les PMCA au niveau du rein de lapin [147].

L'implication des NCX dans le maintien de l'homéostasie du calcium est sans équivoque. Exprimés dans le tissu placentaire, plus précisément au niveau de la membrane basale des syncytiotrophoblastes [120], le rôle des NCX dans le transport de calcium placentaire reste à être précisée.

Le caractère indispensable des NCX est connu. Il a été montré, dans un modèle murin KO en NCX 1, qu'une souris ne peut survivre que quelques jours suivant sa naissance [21, 23, 182, 183]. Certains auteurs corroborent la présence et l'implication des NCX dans le transport de calcium placentaire au niveau des syncytiotrophoblastes mais en spécifiant que son implication est non significative [19, 184, 185]. Williams *et al.*, suggèrent que les PMCA seraient les principaux coordonnateurs des échanges calciques transplacentaires [184]. Enfin, le rôle précis des NCX au niveau des échanges placentaires du calcium reste encore à éclaircir afin de mieux comprendre ses fonctions et implications dans le placenta.

1.8 Le TCTP, « translationally controlled tumour protein »

TCTP signifie « translationally controlled tumour protein ». Cette protéine a été découverte pour la première fois dans les années 90 par trois groupes de chercheurs qui s'intéressaient aux gènes régulés au niveau de la traduction [186].

La TCTP est une protéine hautement conservée et exprimée chez plusieurs plantes et animaux [187]. Auparavant, la TCTP était considérée comme une protéine tumorale. À ce jour, cette protéine n'est plus exclusive aux tumeurs et est impliquée dans une multitude de processus biologiques. En effet, la TCTP peut induire la sécrétion d'histamine à partir de basophiles et est dite HRF « histamine-releasing factor » [188]. La TCTP joue également un rôle dans la croissance cellulaire en plus de posséder une fonction anti-apoptotique (inhibe la Caspase-3) et d'agir comme une cytokine [189]. Malgré cela, ce qui retient notre attention au niveau du TCTP est sa capacité à lier le calcium. Ubiquitaire, la TCTP est capable de lier le calcium sans avoir de motif connu de liaison dans son domaine de liaison au calcium [190, 191].

La TCTP possède une structure caractéristique qui lui est propre. Elle possède un domaine en boucle flexible ainsi qu'un domaine en hélice qui lui est spécifique (Figure 1.16). Cette boucle flexible contient les séquences hautement conservées [186]. Le domaine en hélice lui contient la zone de liaison pour le calcium [191].

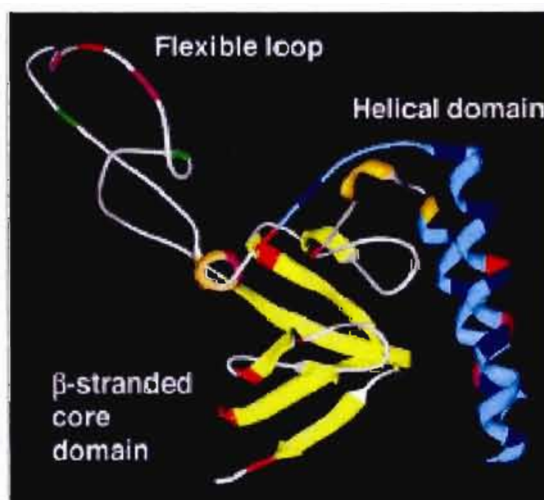


Figure 1.16 Représentation tridimensionnelle de la TCTP [187]. La boucle flexible et le domaine en hélice sont des structures propres aux TCTP.

Jusqu'à présent, la structure génomique, cinq introns et six exons, de la TCTP de la souris, du rat, du lapin et de l'humain a été identifiée. Elle est identique pour chacune des espèces [192]. Les résultats de transcription de la TCTP donnent des ARNm distinctifs du groupe des « translationally controlled mRNAs ». En effet, la séquence -UTR en 5' débute par une séquence 5'-terminale oligopyrimidine. De plus, cette même séquence 5'-UTR est très riche en CG [193].

Il existe diverses voies de régulation de la TCTP. La synthèse de celle-ci peut être régulée par des cytokines, des signaux de stress extracellulaires ou d'apoptose et même des signaux de croissance [186, 190, 193, 194]. Il est connu que la synthèse du TCTP peut être influencée autant au niveau transcriptionnel que traductionnel [193].

Il a été remarqué que, lors d'une diminution du niveau endogène de TCTP (par ARN_{si}), une baisse du transport de calcium est notée [18]. La TCTP est une protéine cytoplasmique présente dans les cytotrophoblastes et syncytiotrophoblastes. Une augmentation de la protéine et des ARNm dans les tissus placentaires à termes a été mesurée [18]. En effet, la TCTP est exprimée dans le placenta dès le premier tiers de la grossesse et son expression est hautement augmentée dans les villosités trophoblastiques au dernier trimestre [18]. Finalement, le niveau de compréhension de cette protéine reste plus ou moins clair. Toutefois, son implication dans le transport de calcium placentaire ne rend pas perplexe. Étant impliquée dans les échanges calciques entre la mère et son fœtus, on suggère même que la TCTP pourrait être régulée par la PTHrP.

1.9 La vitamine D et le récepteur à la vitamine D (VDR), « vitamin-D receptor »

La vitamine D₃ joue un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie du calcium et de la minéralisation du squelette [18]. La vitamine D₃, aussi appelé cholécalciférol, est hydroxylée dans le foie pour former la 25-(OH)D₃. La 25-(OH)D₃ poursuit ensuite son chemin vers les

reins où elle subira à nouveau une seconde hydroxylation, par la 25-(OH)D₃-1α-(OH)ase, pour donner la forme active, la 1,25-(OH)₂D₃ aussi appelé le calcitriol (Figure 1.17). Le taux de transformation de la 25-(OH)D₃, en sa forme active, est sous le contrôle de la PTH [56, 57]. Étant doublement synthétisée par le placenta et les reins du fœtus, le niveau circulant de vit D₃ est malgré tout inférieur au niveau de vit D₃ circulant chez la mère au cours du dernier tiers, autant chez la souris que chez l'humain [195-199].

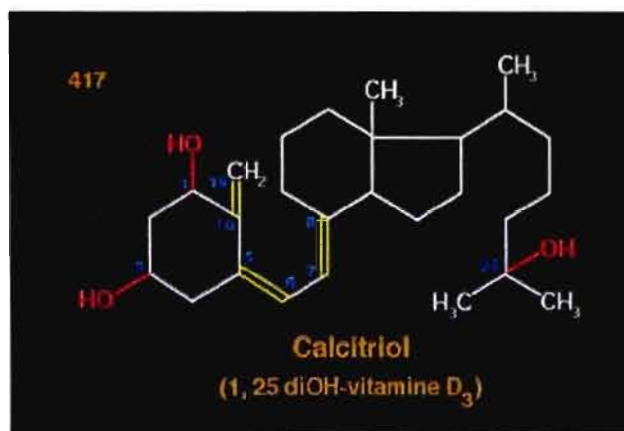


Figure 1.17 Structure chimique de la vitamine D₃. Tiré du site internet de : <http://www.chups.jussieu.fr/polys/biochimie/Mlbioch/POLY.Chp.5.3.html>

Le récepteur à la vitamine D (VDR) est un récepteur nucléaire exprimé dans plusieurs tissus et cellules placentaires et est responsable de lier la forme active de la vitamine D₃. Chez la souris, le VDR est fortement exprimé dès les premiers jours jusqu'à la fin de la gestation [15, 200]. Son expression hâtive dans le développement fœtal expliquerait peut-être son importance dans le développement du squelette [200]. De plus, chez la souris, le VDR est exprimé chez les cellules pariétales du sac vitellin intraplacentaire [15]. La présence du VDR dans ce type cellulaire représente un endroit de choix pour potentiellement réguler l'expression des transporteurs de calcium et ainsi contrôler les échanges calciques transplacentaires.

Il est connu que la vitamine D joue un rôle important pour la mère lors de sa grossesse puisqu'elle est responsable de l'augmentation de l'absorption en calcium par l'intestin [201]. Connaissant l'importance de la PTHrP durant la grossesse, Gallacher et ses collaborateurs croient que la sécrétion de la PTH, le régulateur de la vitamine D₃, serait inhibée par la forte présence de la PTHrP. La PTHrP exercerait un effet sur le récepteur PTH1R et prendrait la place de la PTH [65]. Durant la grossesse, la PTHrP serait donc le principal régulateur du métabolisme calcique et osseux [202]. Mais quel est le rôle précis de la vitamine D₃ au niveau placentaire?

Contrairement à ce qui est connu chez l'adulte, l'implication de la vitamine D₃ et de son récepteur (VDR) dans les échanges calciques placentaires reste encore à être éclaircie. Son métabolisme est bien connu chez la femme mais reste encore nébuleux au niveau du placenta. Kovacs *et al* ont récemment démontré, à l'aide d'un modèle murin KO en VDR (VDR^{-/-}), que le récepteur à la vitamine D₃ n'était pas essentiel au maintien de l'homéostasie phosphocalcique ou à la régulation du transport de calcium placentaire. De plus, ceux-ci ont démontré que l'expression de la PTHrP et de TRPV6 augment chez les KO en VDR [62].

1.10 BUT DU PROJET

Évaluer l'implication de la PTHrP dans les échanges calciques placentaires.

Pour y arriver :

-Mesurer les niveaux de calcium ionisé présents dans la circulation fœtale et maternel chez un modèle murin délété en PTHrP ou en PTH1R.

-Mesurer les niveaux d'expression d'ARNm des différentes protéines de manutention du calcium retrouvées dans le placenta de souris chez un modèle murin délété en PTHrP ou en PTH1R.

1.11 HYPOTHÈSES DE RECHERCHE

1- L'effet d'une délétion en PTHrP ou en PTH1R entraîne une diminution significative du transport de calcium par le placenta chez la souris, plus précisément :

-une diminution importante du niveau de calcium ionisé présent dans la circulation des fœtus ayant subi une délétion de la PTHrP;

-une diminution importante du niveau de calcium ionisé présent dans la circulation des fœtus ayant subi une délétion du PTH1R.

2- L'effet d'une délétion en PTHrP ou en PTH1R entraîne des variations significatives dans l'expression des ARNm des protéines de manutention du calcium dans le placenta de souris.

(Protéines de manutention du calcium : TRPV5, TRPV6, PMCA1, PMCA4, NCX1, NCX2, NCX3, CaBP-9k, CaBP-28k, TCTP, VDR)

CHAPITRE II

ARTICLE SCIENTIFIQUE

J'ai effectué la totalité de cet article; c'est-à-dire : les manipulations, les expérimentations, la recherche bibliographique ainsi que la rédaction du manuscrit.

L'article scientifique mentionné dans ce mémoire sera soumis au journal scientifique *Placenta* et s'intitule :

EFFECT OF A KO IN PTHrP OR PTH1R ON mRNA EXPRESSION LEVEL OF CALCIUM HANDLING PROTEINS IN MOUSE PLACENTA

(L'effet d'un KO en PTHrP ou en PTH1R sur les niveaux d'expression des protéines de manutention du calcium dans le placenta de souris)

M. AMYOT^{1,2}, J. LAFOND^{1,2}.

¹Laboratoire de Physiologie materno-fœtale, Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8. ²Centre de recherche Biomed, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8.

EFFECT OF A KO IN PTHRP OR PTH1R ON mRNA EXPRESSION LEVEL OF CALCIUM HANDLING PROTEINS IN MOUSE PLACENTA

M. AMYOT^{1,2}, J. LAFOND^{1,2,3}.

¹Laboratoire de Physiologie materno-fœtale, Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8. ²Centre de recherche Biomed, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8.

³To whom correspondence should be addressed :

Julie Lafond PhD ; Laboratoire de Physiologie Materno-foetale
Université du Québec à Montréal, Centre de Recherche BioMed
C.P. 8888, Succursale Centre-Ville ; Montréal, Québec, Canada H3C 3P8
Phone : (514)987-3000 ext. 7857 ; Fax : (514) 987-4647
Email : lafond.julie@uqam.ca

Key words : Calcium, placenta, PTHrP, PTH1R, Calcium handling proteins, mRNA

*Abbreviations : CaBP, calcium-binding protein; KO, knockout; NCX, sodium-calcium exchanger; PMCA, plasma-membrane Ca²⁺-ATPase; PTH, parathyroid hormone; PTHrP, parathyroid hormone related protein; PTH1R, parathyroid receptor 1, TCTP, translationally controlled tumor protein; TRPV, transient receptor potential vanilloid; VDR, vitamin D receptor.

2.1 ABSTRACT

PTHrP is an important regulator of placental calcium transfer during gestation. Adequate calcium concentration during pregnancy is essential for assuring fetal growth and development. In this study, we investigated the influence of a knockout in PTHrP or PTH1R on placental calcium transport and on mRNA expression of calcium-handling proteins using a murine model. Ionized calcium was measured *in situ* using a critical care whole blood and electrolytes analyser. Real-time PCR was used to assess mRNA expression measurement of calcium-handling proteins. Loss of PTHrP or PTH1R engendered significant reduction of ionized calcium in fetal circulation. The ionized calcium level of null fetuses in PTHrP or PTH1R was lower than in the wild-type fetuses but had equivalent level to the level found in the normally hypocalcemic mothers. Overall gene expression showed an important upregulation of TRV6 and TCTP for null PTHrP placentas compared to wild-type. Deletion of PTH1R had remarkable influence on calcium mediators CaBP-9k and TCTP as well as on VDR. Both TCTP and VDR were downregulated in KO PTH1R placentas in comparison with wild-type. Responsible for calcium entry, TRPV5 was also significantly reduced in contrast with wild-type. On the other hand, CaBP-9k reacted to the ablation of the PTH1R with a 2.5-fold mRNA increase. These results demonstrate that placental TRV6 and TCTP are the main calcium-handling proteins responding to a deletion of PTHrP. In null PTH1R placentas, mRNA expression of channels coordinating the calcium entry showed no variation for TRPV6 while TRPV5 was downregulated. Again in null PTH1R placentas, mRNA expression of intracellular calcium buffer proteins was reduced (TCTP) or unchanged (CaBP-28k) with the exception of CaBP-9k being upregulated. As for channels responsible for calcium extrusion (NCX and PMCA) into the foetal circulation, no modification in their mRNA expression was noted. In conclusion, placental calcium transport is obviously reduced when PTHrP or PTH1R are altered. The mRNA expression of placental calcium-handling protein is reacting to a loss of PTHrP or PTH1R. Intriguingly, no significant modification in mRNA expression of proteins responsible for placental calcium extrusion was noted.

2.2 INTRODUCTION

Adequate calcium concentration during fetal development is crucial for the survival of the fetus [1]. Calcium is one of the most abundant mineral in the body and is essential for bone mineralization [2]. Ionized calcium is the active form of calcium and is implicated in number of biological process acting as an intracellular messenger [3, 4]. During mouse gestation, fetal blood is hypercalcemic compared to the maternal blood. The calcemic gradient established between the mother and her fetus is responsible for maintaining the high level of calcium in the fetal circulation [5]. The third trimester, corresponding to the last five days of gestation for the mouse, represents a decisive period for calcium transfer. A total of 12 mg of calcium is transferred during this period [6] and corresponds to the mineralization of the fetal skeleton [7]. The parathyroid hormone-related protein (PTHrP) is known to be the principal regulator of calcium transfer from mother to fetus [8]. Before entering fetal circulation, calcium goes through three steps: intrusion through the placental barrier, mediation of intracellular calcium and extrusion through the fetal blood circulation [9]. TRPV5 and TRPV6 are channels found on the maternal side of the placenta and are responsible for calcium entry [10]. Calcium is then taking care of by calcium mediators such as CaBP-9k, CaBP-28k and TCTP which facilitates the expulsion of the calcium [11-15]. Calcium passes through the fetal side of the placenta via PMCA1 and PMCA4 as well as sodium-calcium exchangers (NCX1, NCX2, and NCX3) [16-19]. Those channels and transporters in charge of transporting placental calcium are called calcium-handling protein and are under the regulation of calcitropic hormones.

PTHrP is an important regulator of calcium transport in the placenta. It was previously shown, in a murine model KO in PTHrP^{-/-} and PTH1R^{-/-}, that ionized calcium level was reduced in fetal blood [20]. It was also proven that the alteration of the PTHrP protein (PTHrP^{-/-}) had an effect on the mRNA expression level of calcium-handling protein. Expression level of CaBP-9k was greatly reduced in the intraplacental yolk sac when PTHrP was deleted [21]. With those findings, it is now more obvious that the presence of the

PTHrP and its receptor PTH1R in the fetal environment are key elements assuring proper placental calcium transfer. Other regulating factor such as vitamin D was shown to be in part implicated in fetal mineral homeostasis [22, 23]. On the other hand, a recent study using KO mice in VDR ($VDR^{-/-}$) demonstrated that the vitamin D receptor VDR is not necessary for the regulation of placental calcium [24].

The purpose of this study is to investigate the effect of a knockout in PTHrP protein ($PTHrP^{-/-}$) or its receptor ($PTH1R^{-/-}$) on the placental calcium transfer as well as on the mRNA expression of calcium-handling protein found in the mouse placenta such as, the TRPVs, the PMCA, the NCXs, the CaBPs, the VDR and the TCTP.

2.3 MATERIALS AND METHODS

Mice strain. Swiss Black mice were used in this experiment. Food and water were given *ad libitum* following a normal veterinary diet. Heterozygosis male and female mice (PTHrP^{+/-} & PTH1R^{+/-}) were kindly provided by Dr. Kronenberg from Harvard University and were housed at UQAM University animal facilities. Heterozygosis male and female were bred together producing homozygosis knock out mice in PTHrP^{-/-} and PTH1R^{-/-}. Every animal procedures were performed according to UQAM University CIPA (Comité Institutionnel de Protection des Animaux).

Breeding. Male and female of each respective strain (PTHrP^{+/-} & PTH1R^{+/-}) were placed together in the late afternoon. Females were separated from the male early the next morning after observation of a vaginal plug (consider day 0.5 of gestation). For better breeding efficiency, two female at a time were introduced in the male cage. Eighteen days later (day 18.5) female mice were taking away for caesarean section procedures. Isoflurane was used for anaesthesia during caesarean section allowing the collect of placentas, fetus and ionized calcium measurement.

Genotyping. Genotyping was divided into two categories: A- Genotyping the male and female (after weaning) for the breeding of the colony using ear punch. B- Genotyping the newborn (day 18.5 of gestation) after each caesarean section using a section of tail.

DNA Purification. Genomic DNA was extracted from ear punch or tail clip using a *DNeasy Blood & Tissue Kit* from *Qiagen*. This method allowed a rapid and efficient purification of total cellular DNA without organic extraction or ethanol precipitation. After extraction, genome refinement was completed by amplifying gDNA with PCR technique using pairs of oligonucleotide primers (Table 1) specific for the native PTHrP and PTH1R. Amplification of genomic DNA was enabled using a *HotStarTaq DNA Polymerase Kit* from *Qiagen* working with a *Thermal Cycler* from *Perkin-Elmer*. PCR conditions: 5 min. at 95°C (initialization); 1

min. at 94°C (denaturation); 1 min. for annealing; 1 min. at 72°C (elongation); 10 min. at 72°C (final elongation); 40 cycles. Knockout mutants (PTHrP^{-/-} & PTH1R^{-/-}) contained a neomycin sequence (Kronenberg HM, Harvard University) inserted in their genome permitting the identification of the homozygous offspring's.

Caesarean sections and in situ ionized calcium measurements. At day 18.5 of gestation, caesarean sections were performed. Isoflurane was used for anaesthesia. Before proceeding with surgery, 100 µL of maternal blood was collected by intracardiac puncture, using heparinized syringes, and immediately analysed with *Stat Profile CCX* from *Nova Biomedical*. In less than a minute, measurement of ionized calcium were obtained. Following that procedure, caesarean section was executed. Each fetus were taken and removed from its amniotic sac. Necks were incised to transect the carotid and the jugular vessels and whole blood was collected into heparinized capillary tubes. A minimum of 50 µL of blood was necessary to get a reading of ionized calcium with the *Stat Profile CCX*. For that reason, every blood sample had to be diluted with Normosol, a physiologically stabilized multi-electrolyte solution containing restrained mobility anions from Abbott Laboratories, to attain the necessary volume (50 µL). Tail and placenta from each newborn were frozen without delay in liquid nitrogen for later DNA extraction (placenta) and genotyping (tail).

RNA isolation and cDNA isolation. Total RNA was isolated using RNeasy mini-kit (Qiagen) and reversed transcribed (cDNA) using an Omniscript Reverse transcriptase kit (Qiagen).

RNA isolation: Approximately 30 mg of placental tissue was used and homogenized in RLT buffer. The lysate was centrifuged (3 min. at 15 000 rpm) and supernatant collected. Supernatant was mixed with 1 volume of ethanol 70% and transferred on an RNeasy spin column and centrifuged 15 sec. at 10 000 rpm. The column was washed once (15 sec. at 10 000 rpm) with RW1 buffer and twice (15 sec. at 10 000 rpm; 2 min. at 10 000 rpm) with RPE buffer. Purified RNA was eluted with 50 µL RNase-free water (1 min. at 10 000 rpm).

cDNA isolation: 2 µg of RNA template was mixed with master mix (10X buffer RT; dNTP (5mM); oligo-dt primer (10 µM); RNase inhibitor (10 u/µL); Omiscript reverse transcriptase;

RNase-free water) and incubated 60 minutes at 37°C. This reversed-transcribed product was used for real-time PCR.

Quantification of Ca²⁺-handling proteins by REAL-TIME PCR. Gene expression of the Ca²⁺-handling proteins present in mice placenta was assessed by quantitative real-time PCR using the Light Cycler 480 System from Roche. PCR was carried out with SYBR Green I Master from Roche using specific primer sequences generated by Operon Oligo (Table 2). The HPRT1 gene was used as an internal control. *Real-time PCR conditions were as followed:* 1 cycle for preincubation (5 min. at 95°C), between 46 and 55 cycles (depending on the gene) for amplification (5 sec. at 95°C; 10 sec. at 72°C), 1 cycle for melting curve (5 sec. at 95°C; 30 sec. at 60°C; 72°C continuous) and 1 cycle for cooling (10 sec. at 40°C).

Statistical Analysis. Data are presented as means ± S.E. Data analysis were performed using GraphPad Software PRISM 3.03. ANOVA and Student T-test were used to assess statistical significance. A P-value of < 0.05 was considered statistically significant for all tests.

2.4 RESULTS

MEASURES OF CALCIUM IONIZED LEVEL IN NEWBORN BLOOD

Ionized calcium was measured *in situ* from every newborn after each caesarean section (Day 18.5). Ionized calcium measured in the KO mutant's (PTH1R^{-/-}) blood was interestingly analogous to the ionized calcium found in the maternal blood (fig. 2.1b). Blood coming from the normal (PTH1R^{+/+}) and heterozygosis (PTH1R^{+/-}) newborn resulted in an hypercalcemic state (fig. 2.1b). On the other hand, obliterating the PTHrP protein (PTHrP^{-/-}) had similar effect causing a significant reduction of ionized calcium in the newborn attaining the levels seen in the mother (fig. 2.1a). The levels of ionized calcium found in the blood of the wild-type (PTHrP^{+/+}) and heterozygosis (PTHrP^{+/-}) were again significantly higher than the levels measured in the mother. However, this increase was only significant for the WT when compared to the KO (PTHrP^{-/-}) (fig. 2.1a).

EXPRESSION OF CALCIUM CHANNELS AND TRANSPORTERS IN THE PLACENTA

Plasma membrane calcium-ATPase (PMCA1, PMCA4). To evaluate the implication of the calcium channels and transporters in the mouse placenta, gene expression was measured in all three models (wild-type: ^{+/+}, heterozygosis: ^{+/-}, KO: ^{-/-}) for PTHrP and PTH1R. Figure 2.2a shows a significant mRNA divergence in the expression of PMCA1 between the knockout PTHrP^{-/-} and the heterozygosis PTHrP^{+/-}. Nor PMCA1 nor PMCA4 showed any variation in their mRNA expression when the receptor was disrupted neither in the heterozygosis nor the in the PTH1R null placentas (fig 2.2b and fig. 2.3b). On the other hand, mRNA level of PMCA4 gene increased significantly in the heterozygosis placentas (PTHrP^{+/-}) compared to the knockout and to the wild-type placentas (fig. 2.3a).

Transient receptor potential – vanilloid family (TRPV5, TRPV6). Equal level of gene expression was measured for TRPV5 in the KO or heterozygosis placenta in PTHrP (fig. 2.4a) in contrast to a two fold decrease for the KO (PTH1R^{-/-}) and heterozygosis PTH1R placentas (fig. 2.4b). In the absence of a functional PTHrP protein (PTHrP^{-/-}), mRNA level of TRPV6 significantly doubled (fig 2.5a). On the other hand, the dysfunctional receptor for PTHrP (PTH1R^{-/-}) had no significant effect on the TRPV6 gene expression. Yet, in the PTH1R heterozygosis placentas (PTH1R^{+/-}), TRPV6 gene expression diminished considerably compared to the wild type placentas (fig. 2.5b).

Calbindin-D (CaBP9K- CaBP28K). Interestingly, mRNA level of CaBP9K in the KO model for PTHrP is stable compared to the wild-type (fig. 2.6a) but increases by 2.5 fold in the PTH1R KO placentas (fig. 2.6b). Conversely, significant variation in the DNA expression of CaBP9K was revealed in PTHrP^{+/-} (fig. 2.6a), demonstrating an augmentation when compared to the PTHrP^{-/-} placenta. As for the CaBP28K, neither experimental model showed variations in their mRNA profile (fig. 2.7a and 2.7b).

Na⁺/Ca²⁺-Exchanger (NCX1, NCX2, NCX3). No imperative changes in the gene expression were noted in this family of exchanger. In fact, the knockout of the protein (PTHrP) or receptor (PTH1R) engenders no mRNA variation when comparing to wild-type placentas. However, fig. 2.8a (PTHrP^{+/-}) and fig. 2.9b (PTH1R^{+/-}) shows a significant reduction of the NCX1 and NCX2 gene expressions respectively in the heterozygosis placentas when compared to the knockout placentas.

Translationally controlled tumour protein (TCTP). Figure 2.11a shows a significant rise of the gene expression for TCTP in PTHrP^{-/-} and PTHrP^{+/-} placentas. On the other hand, in figure 2.11b, we noticed that the mRNA level of TCTP's in PTH1R^{-/-} and PTH1R^{+/-} placentas are again similar but strongly reduced (two fold) compared to PTH1R wild-type placentas.

Vitamin D receptor (VDR). Knocking out the PTHrP protein had no impact on the vitamin D receptor placental expression when compared to the wild type (fig. 2.12a). In contrast, the disruption on the receptor (PTH1R) had a significant effect down regulating the gene expression of VDR in PTH1R^{-/-} and PTH1R^{+/-} placentas (fig. 2.12b).

2.5 DISCUSSION

The present study demonstrated the impact of a knockout in PTHrP (PTHrP^{-/-}) and in PTH1R (PTH1R^{-/-}) on the expression level of calcium-handling protein present in the mouse placenta as well as on placental calcium transfer. Results obtained with the null PTHrP newborn (PTHrP^{-/-}) were not unexpected and showed significant reduced ionized calcium measurement, as previously demonstrated by Kovacs and his colleagues in 1996 [20]. Imperative decrease in ionized calcium was similarly noted for the null PTH1R^{-/-} mutant. As it was well demonstrated in the past [25], mothers were naturally hypocalcemic in comparison with the wild-type newborn. On the other hand, level of ionized calcium measured in PTHrP^{-/-} and PTH1R^{-/-} mutants were comparable to those of the mothers. It was well established that equivalent level of ionized calcium measured between the mother and her fetus had no mortality impact [20] but clearly demonstrated that calcium homeostasis is disturbed. The calcium gradient established during gestation, making higher circulating level of calcium in the fetus [25], was altered with the deletion of PTHrP or PTH1R. Analysing the expression level of different calcium-handling protein certainly brings to a higher level the understanding of calcium transport in the placenta.

Not long ago, colleagues from our research team found out, using gene silencing, that suppression of TRPV5 and TRPV6 expression significantly reduced trophoblast calcium uptake by about 50% (data submitted). In that same direction, we expected that the deletion of PTHrP or PTH1R would have a considerable effect on TRPV5-TRPV6 placental expression. In fact, a 2-fold decrease in mRNA expression of TRPV5 was assessed for PTH1R^{-/-} and PTH1R^{+/-}. Unaltered expression of TRPV5 was obtained for PTHrP^{-/-} and PTHrP^{+/-}. On the contrary, TRPV6 expression almost tripled in PTHrP^{-/-} placentas. Deleting the receptor had significant impact on TRPV5 expression and pushed us to assume that similar results would be encountered for TRPV6. Unfortunately, the deletion of PTH1R engendered no modification in TRPV6 expression except for a small downregulation in PTH1R^{+/-} mutants. We believe that when PTHrP is being deleted, TRPV6 is the dedicated receptor assuring an

adequate calcium entry. It seems logical since TRPV6 is 800-fold more expressed than TRPV5 in the placenta [10]. Knowing that calcium homeostasis will be taken care of by TRPV6, TRPV5 doesn't need to significantly modulate its mRNA expression. We also think that another pathway, other than the PTHrP/PTH1R, could regulate placental calcium entry when PTH1R is dysfunctional. This pathway would strongly increase placental calcium uptake through unknown channels and indirectly cause the downregulation of TRPV5. Like TRPV6 in the PTHrP^{-/-} model, TRPV5 would be the principal player responsible for reducing the placental penetration of calcium when the receptor is knocked down.

It is known that TRPV5 and TRPV6 are present in the placental environment, more precisely in the syncytiotrophoblasts [26]. By their specific location, we strongly believed that they would be in part responsible for the intrusion of calcium through the placenta. Indeed, Suzuki et al, [27] recently demonstrated the importance of TRPV6 in calcium transport. Their knockout mice strain in TRPV6 showed a lower concentration of calcium in fetal blood and a boost of 14-fold in the last four days of gestation in TRPV6 mRNA expression. Our result goes in the same direction showing the upregulation of TRPV6 in PTHrP knockout placentas. This demonstrates that TRPV6 placental expression is reacting to a deficiency in PTHrP and is clearly implicated in calcium transport. Are TRPV5 and TRPV6 really under the direct control of the binding of the peptide (PTHrP) to its receptor (PTH1R)? Few authors have demonstrated that 1,25-(OH)₂D₃ regulates TRPV5 and TRPV6 expression [9, 28-30]. Does a deficiency in PTHrP or PTH1R engender a modulation of the TRPV's through 1,25-(OH)₂D₃?

As for PMCA1 and PMCA4, they were noticeably downregulated in the PTHrP^{-/-} mutants when compared to PTHrP^{+/-} placentas. mRNA expression of PMCA4 in PTHrP^{+/-} placentas also showed an important reduction when compared to heterozygosis. Interestingly, no difference was noted between the mRNA expression of PMCA1 and PMCA4 in PTHrP^{-/-} and wild type. The expected results with heterozygosis mutants were that they would behave like the wild types. Unfortunately they did not. These findings make us believe that mRNA

expression of placental calcium-handling proteins could be impaired in heterozygosis mutants. The heterozygosis genotype itself could have an effect on mRNA expression of certain transporters or channels (ex: PMCA1, PMCA4, TRPV5) but globally has no significant impact on calcium transport. No difference was noted for ionized calcium measurement when comparing PTHrP^{+/+} with PTHrP^{+/-} and PTH1R^{+/+} with PTH1R^{+/-} (see figure 2.1). Thus, these results will certainly need to be further investigated.

No mRNA variation was measured for NCX2 and NCX3 in PTHrP^{-/-} placentas but an augmentation was seen in NCX1 when compared to heterozygosis. On the other hand, altering the PTH1R had minor effect on NCX's and PMCA's mRNA expression. As a matter of fact, only NCX2 was affected and upregulated when deleting the PTH1R. The increased mRNA expression of NCX2 in PTH1R^{-/-} model was only significant when compared to the PTH1R^{+/-} model. Once again, surprising results were obtained with heterozygosis placentas and further experiments should definitively be conduct. When comparing null and wild type placentas, whether we knockdown PTHrP or PTH1R, no significant change could be measured in mRNA expression. Knowing that PTHrP^{-/-} and PTH1R^{-/-} reduce calcium transport, our first thought was that placental genes in charge of calcium extrusion would undergo a downregulation. Real-time PCR showed that PMCA's and NCX's are present in the placenta but their mRNA expression is not modulated in the KO placentas. Could the lack of calcium extrusion into the fetal circulation be caused by a protein malfunction?

As previously shown by Kovacs and colleagues [20], PTHrP is known to be implicated in calcium transport. We strongly expected a variation in mRNA expression of calcium mediators such as, CaBP's, TCTP and the vitamin D receptor (VDR) in the null mutants. Also, we believed that, indirectly, vitamin D would have tried to compensate the lost of PTHrP upregulating the expression of its receptor (VDR) even though it was proven that VDR is not required for the regulation of placental calcium transfer [24]. However, little effect was recorded with the deletion of PTHrP.

Little is known about TCTP and its action in the placenta. Figure 2.13a shows that TCTP is enhanced in the placenta of PTHrP null fetus. The presence of this protein was formerly demonstrated in the placenta of first and last trimester and is thought to be implicated in calcium transport [15]. Our results show that TCTP does in fact respond to a PTHrP loss by strongly being liven up (3-fold). TCTP is probably responding to an intracellular calcium increase but is unfortunately unable to adequately mediate its extrusion into the fetal circulation. Acting as an intracellular calcium buffer, is TCTP working specifically with the PMCA's or NCX's? If not, why isn't the calcium being able to pass through?

Looking at what is happening in the PTH1R KO mutants is an entirely other challenge. The ablation of the PTH1R receptor had a much stronger impact on the mRNA expression of calcium-handling protein. Calcium mediators are the one mostly affected by the KO. Indeed, VDR and TCTP were downregulated in contrast to an elevation of CaBP-9k expression (2.5-fold). CaBP-9k is in fact trying to counter react positively to the unstable calcemic situation. CaBP's are known to be regulated by PTHrP [13, 31]. Our results, showing an increase in CaBP-9k, are contradictory to what was previously shown by Kovacs team in 2002 [13] in which they demonstrated that CaBP-9k expression is downregulated in null PTHrP placentas but such variation was not noted in the PTH1R null placentas. Moreover, a UK research team recently demonstrated that, in contrast to Kovacs and our team, CaBP-9k is upregulated in placentas of null-PTHrP fetuses [32]. CaBP-9k is without a doubt implicated in the placental calcium transfer and his expression may well be dependent of the presence of PTHrP or PTH1R. Those contradictory results are impelling us to believe that mRNA expression of CaBP-9k may strongly be dependent on days of gestation. Could a delay of several hours or even a day have a significant effect on CaBP-9k mRNA expression knowing that the last few days are critical for calcium exchange and that CaBP-9k is known to be upregulated during the last trimester [11, 33]? Did Kovacs, Bond or our team measured CaBP-9k mRNA expression at different times? This will certainly need to be deepened.

In the end, the placental barrier seems to be in a more adaptive state and is more urgently trying to adjust to the calcium variation in the PTH1R KO placentas than in the PTHrP KO placentas.

Thoughts on our results. We found our results to be somehow surprising and interesting when we look at how the calcium-handling proteins reacted to the KO in PTHrP and PTH1R. It was well established that PTHrP is an important regulator of calcium for the fetus [13, 20, 34, 35] and we had expected a different scenario concerning the expression of the calcitropic gene. In the PTHrP KO figure, the placenta is trying to increase its calcium entry via the TRPV6. The intracellular calcium is then mediated by the cytoplasmic protein TCTP. The maternal side of the placenta, corresponding to the brushed-border membrane in human, seems to cooperate to the loss of PTHrP by upregulating TRPV6. TRPV6 facilitates the entry of maternal calcium through the placental membrane and TCTP adjusts its expression level to accommodate the novel calcium concentration. The hypocalcemic state of the fetus could be explained by the non adaptive feedback of the proteins responsible for the extrusion of calcium through the fetal blood circulation (PMCA's and NCX's). It was shown that PMCA's and NCX's are found in the placenta and that they are implicated in calcium homeostasis [36-40]. Unfortunately, our results showed no modification in their mRNA expression level. Although PMCA's and NCX's did not showed significant changes in their expression, it does not suggest that those calcium-handling proteins are not functional or that they do not have an important role in calcium transfer. In that case, TRPV6 and TRPV5 could supply the placenta with sufficient calcium but the basal membrane of the placenta is unable to expel an adequate level of calcium to the fetus. As for the PTH1R KO model (fig 2.13b), the placental side facing the fetus is behaving like the PTHrP KO model. None of the channel or exchanger responsible for calcium extrusion was up or downregulated. The placenta does not seem to respond to the hypocalcemic situation of the fetus by upregulating any channels. Only the CaBP-9k expression went higher after the PTH1R deletion.

At this point, some questions remain unanswered: When the PTH1R is not functional, is the placenta compensating the calcium entry through another pathway? The upregulation of CaBP-9k is certainly reacting to an intracellular calcium change. If there is an augmentation in intracellular calcium, how could we explain the downregulation of VDR, TCTP and none for CaBP-28k? Also, if the placenta increases its calcium entry when deleting the receptor, why isn't TRPV6 upregulated and why is TRPV5 expression reduced? Does calcium penetrate the placenta through unknown channels or receptors and are they regulated by another pathway?

In summary, deleting the PTHrP fairly modifies the expression level of calcium-handling proteins in the mouse placenta. Only TRPV6 and TCTP are upregulated and could participate in part in a calcium raise. If rise there is, the placenta is still unable to expel adequately the calcium into the fetal blood circulation. Thus, the alteration of PTH1R reduces the calcium transport, similarly to what is seen with the disruption of the PTHrP, but had a stronger effect on the expression of genes implicated in calcium homeostasis. TRPV5 was found to be downregulated as well as VDR and TCTP in contrast to a contradictory upregulation of CaBP-9k.

This research confirms furthermore the importance of the PTHrP and his receptor PTH1R in the placental calcium equilibrium. Its regulating influence on the calcium-handling protein certainly needs to be pushed forward. Our team is actually trying to evaluate the protein profile of the calcium-handling protein found in the null, heterozygosis and wild-type placentas. Measuring protein expression and activity of the calcium-handling proteins will undoubtedly allow a better understanding by correlating those results with mRNA expression.

2.6 FIGURE LEGEND

Figure 2.1: Ionized calcium measured in, wild-type, heterozygosis and null fetuses in a) PTHrP b) PTH1R colonies. Ionized calcium was measured *in situ* from total blood of 18.5 days old fetuses. Ionized calcium was collected from seven dam for PTHrP colony and six dam for PTH1R colony. Measurements from newborn were done on PTHrP wild-type fetus (n=4); PTHrP heterozygosis fetus (n=7) and PTHrP null fetus (n=5). Ionized calcium from PTH1R colony was measured in wild-type fetus (n=4), heterozygosis fetus (n=4) and homozygosis fetus (n=5). Results represent mean \pm SEM. (*p \leq 0.05).

Figure 2.2: Effect of a knockout a) in PTHrP or b) PTH1R on placental gene expression of PMCA1. Expression level of PMCA1 gene was assessed using quantitative real-time PCR. HPRT1 was used as internal control gene. Gene expression was expressed as ratio of wild-type (considered as control). Control placentas in PTHrP (n=10) and PTH1R (n=13). Heterozygosis placentas in PTHrP (n=10) and PTH1R (n=7). Null placentas in PTHrP (n=10) and PTH1R (n=18). Ratio of relative mRNA levels was calculated as presented as the mean \pm SE. *p \leq 0.05.

Figure 2.3: Effect of a knockout a) in PTHrP or b) PTH1R on placental gene expression of PMCA4. Expression level of PMCA4 gene was assessed using quantitative real-time PCR. HPRT1 was used as internal control gene. Gene expression was expressed as ratio of wild-type (considered as control). Control placentas in PTHrP (n=10) and PTH1R (n=13). Heterozygosis placentas in PTHrP (n=10) and PTH1R (n=7). Null placentas in PTHrP (n=10) and PTH1R (n=18). Ratio of relative mRNA levels was calculated as presented as the mean \pm SE. *p \leq 0.05.

Figure 2.4: Effect of a knockout a) in PTHrP or b) PTH1R on placental gene expression of TRPV5. Expression level of TRPV5 gene was assessed using quantitative real-time PCR. HPRT1 was used as internal control gene. Gene expression was expressed as ratio of wild-type (considered as control). Control placentas in PTHrP (n=10) and PTH1R (n=13). Heterozygosis placentas in PTHrP (n=10) and PTH1R (n=7). Null placentas in PTHrP (n=10) and PTH1R (n=18). Ratio of relative mRNA levels was calculated as presented as the mean \pm SE. *p \leq 0.05.

Figure 2.5: Effect of a knockout a) in PTHrP or b) PTH1R on placental gene expression of TRPV6. Expression level of TRPV6 gene was assessed using quantitative real-time PCR. HPRT1 was used as internal control gene. Gene expression was expressed as ratio of wild-type (considered as control). Control placentas in PTHrP (n=10) and PTH1R (n=13). Heterozygosis placentas in PTHrP (n=10) and PTH1R (n=7). Null placentas in PTHrP (n=10) and PTH1R (n=18). Ratio of relative mRNA levels was calculated as presented as the mean \pm SE. *p \leq 0.05.

Figure 2.6: Effect of a knockout a) in PTHrP or b) PTH1R on placental gene expression of CaBP-9k. Expression level of CaBP-9k gene was assessed using quantitative real-time PCR. HPRT1 was used as internal control gene. Gene expression was expressed as ratio of wild-type (considered as control). Control placentas in PTHrP (n=10) and PTH1R (n=13). Heterozygosis placentas in PTHrP (n=10) and PTH1R (n=7). Null placentas in PTHrP (n=10) and PTH1R (n=18). Ratio of relative mRNA levels was calculated as presented as the mean \pm SE. *p \leq 0.05.

Figure 2.7: Effect of a knockout a) in PTHrP or b) PTH1R on placental gene expression of CaBP-28k. Expression level of CaBP-28K gene was assessed using quantitative real-time PCR. HPRT1 was used as internal control gene. Gene expression was expressed as ratio of wild-type (considered as control). Control placentas in PTHrP (n=10) and PTH1R (n=13). Heterozygosis placentas in PTHrP (n=10) and PTH1R (n=7). Null placentas in PTHrP (n=10) and PTH1R (n=18). Ratio of relative mRNA levels was calculated as presented as the mean \pm SE. * $p \leq 0.05$.

Figure 2.8: Effect of a knockout a) in PTHrP or b) PTH1R on placental gene expression of NCX1. Expression level of NCX1 gene was assessed using quantitative real-time PCR. HPRT1 was used as internal control gene. Gene expression was expressed as ratio of wild-type (considered as control). Control placentas in PTHrP (n=10) and PTH1R (n=13). Heterozygosis placentas in PTHrP (n=10) and PTH1R (n=7). Null placentas in PTHrP (n=10) and PTH1R (n=18). Ratio of relative mRNA levels was calculated as presented as the mean \pm SE. * $p \leq 0.05$.

Figure 2.9: Effect of a knockout a) in PTHrP or b) PTH1R on placental gene expression of NCX2. Expression level of NCX2 gene was assessed using quantitative real-time PCR. HPRT1 was used as internal control gene. Gene expression was expressed as ratio of wild-type (considered as control). Control placentas in PTHrP (n=10) and PTH1R (n=13). Heterozygosis placentas in PTHrP (n=10) and PTH1R (n=7). Null placentas in PTHrP (n=10) and PTH1R (n=18). Ratio of relative mRNA levels was calculated as presented as the mean \pm SE. * $p \leq 0.05$.

Figure 2.10: Effect of a knockout a) in PTHrP or b) PTH1R on placental gene expression of NCX3. Expression level of NCX3 gene was assessed using quantitative real-time PCR. HPRT1 was used as internal control gene. Gene expression was expressed as ratio of wild-type (considered as control). Control placentas in PTHrP (n=10) and PTH1R (n=13). Heterozygosis placentas in PTHrP (n=10) and PTH1R (n=7). Null placentas in PTHrP (n=10) and PTH1R (n=18). Ratio of relative mRNA levels was calculated as presented as the mean \pm SE. *p \leq 0.05.

Figure 2.11: Effect of a knockout a) in PTHrP or b) PTH1R on placental gene expression of TCTP. Expression level of TCTP gene was assessed using quantitative real-time PCR. HPRT1 was used as internal control gene. Gene expression was expressed as ratio of wild-type (considered as control). Control placentas in PTHrP (n=10) and PTH1R (n=13). Heterozygosis placentas in PTHrP (n=10) and PTH1R (n=7). Null placentas in PTHrP (n=10) and PTH1R (n=18). Ratio of relative mRNA levels was calculated as presented as the mean \pm SE. *p \leq 0.05.

Figure 2.12: Effect of a knockout a) in PTHrP or b) PTH1R on placental gene expression of VDR. Expression level of VDR gene was assessed using quantitative real-time PCR. HPRT1 was used as internal control gene. Gene expression was expressed as ratio of wild-type (considered as control). Control placentas in PTHrP (n=10) and PTH1R (n=13). Heterozygosis placentas in PTHrP (n=10) and PTH1R (n=7). Null placentas in PTHrP (n=10) and PTH1R (n=18). Ratio of relative mRNA levels was calculated as presented as the mean \pm SE. *p \leq 0.05.

Figure 2.13: Overall representation of how mRNA expression of calcium-handling proteins is being regulated when deleting a) the PTHrP or b) the PTH1R in the mouse placenta. Only comparison between wild-type and null placentas were shown in this figure. An mRNA upregulation is shown by a twelve o'clock pointing arrow and a downregulation by a six o'clock pointing arrow. « X » shows no significant mRNA variation.

2.7 TABLES

Table 1 Mice primer sequences used for PCR.

GENE	PRIMERS
Native PTHrP	5'-CTA CTG CAT GAC AAG GGC AAG T-3' (forward)
	5'-CTT ATA ATC CCA GCA TCT GAG AGG C-3' (reverse)
	5'-CAT CGC CTT CTA TCG CCT TCT TGA C-3' (forward neo)
Native PTH1R	5'-CCA CCA ATG TGA GTT CCT ACA GAA A-3' (forward)
	5'-ATG GGA CAG TCA GGA CAA GC-3' (reverse)
	5'-TCC AGA CTG CCT TGG GAA AAG CGC-3' (reverse neo)

Table 2 Mice primer sequences used for REAL-TIME PCR.

GENE	PRIMERS
PMCA1	5'- GTG-AGA-CAC-CTG-GAC-GCT-TGT-GAG-ACC -3' (forward)
	5'- TCC-CCG-TTA-CCA-GGT-AGG-ACA-GGA -3' (reverse)
PMCA4	5'- CTG-TGG-GAA-CCC-CGT-TGG-TCT-CTT-TC -3' (forward)
	5'- GCA-CCC-AGG-CGA-TGG-ATG-GCA-AAG-CT -3' (reverse)

Table 2 (continued)

TRPV5	5'- GAA-ACT-TCT-CAA-TTG-GTG-GGT-CAG -3' (forward)
	5'- TTT-GCC-GGA-AGT-CAC-AGT-T -3' (reverse)
TRPV6	5'- GCA-CAG-GCC-TTC-CAG-CAA-CA -3' (forward)
	5'- GTA-CTC-CCA-GCC-CTC-CCC-ATC-T -3' (reverse)
CaBP9K	5'- GTG-TGC-TGA-GAA-GTC-TCC -3' (forward)
	5'- CAT-TGT-GAA-AGC-TTT-TTG-AAG -3' (reverse)
CaBP28K	5'- CAG-AAT-CCC-ACC-TGC-AGT-C -3' (forward)
	5'-GTA-GTA-ACC-TGG-CCA-TCT-CTG -3' (reverse)
NCX1	5'- TTG-GCT-GCA-CCA-TTG-GTC-TGA-AAG -3' (forward)
	5'- AGG-AGC-ACA-AAC-AGG-GAA-GAT-GTG -3' (reverse)
NCX2	5'- TCT-GCA-TCC-TGG-TCA-TTG-GTC-TGC -3' (forward)
	5'- GGC-GAA-GAC-GGT-GAA-CAG-TGT-GAC -3' (reverse)
NCX3	5'- ACC-CAT-TCC-TGG-AGG-GAC-CAA-TTC -3' (forward)
	5'- GGT-GCC-GAA-TGC-CAC-AAA-AAC-AAC -3' (reverse)

Table 2 (continued)

TCTP	5'-ATG-ATC-ATC-TAC-CGG-GAC-CTC-A-3' (forward)
	5'-GGT-GAC-TAC-TGT-GCT-TTC-GGT-3' (reverse)
VDR	5'CTC-CTC-GAT-GCC-CAC-CAC-AAG-ACC-TAC-G-3' (forward)
	5'GTG-GGG-CAG-CAT-GGA-GAG-CGG-AGA-CAG-3' (reverse)
HPRT1	5'- TTA-TCA-GAC-TGA-AGA-GCT-ACT-GTA-ATG-ATC -3' (forward)
	5'- TTA-CCA-GTG-TCA-ATT-ATA-TCT-TCA-ACA-ATC -3' (reverse)

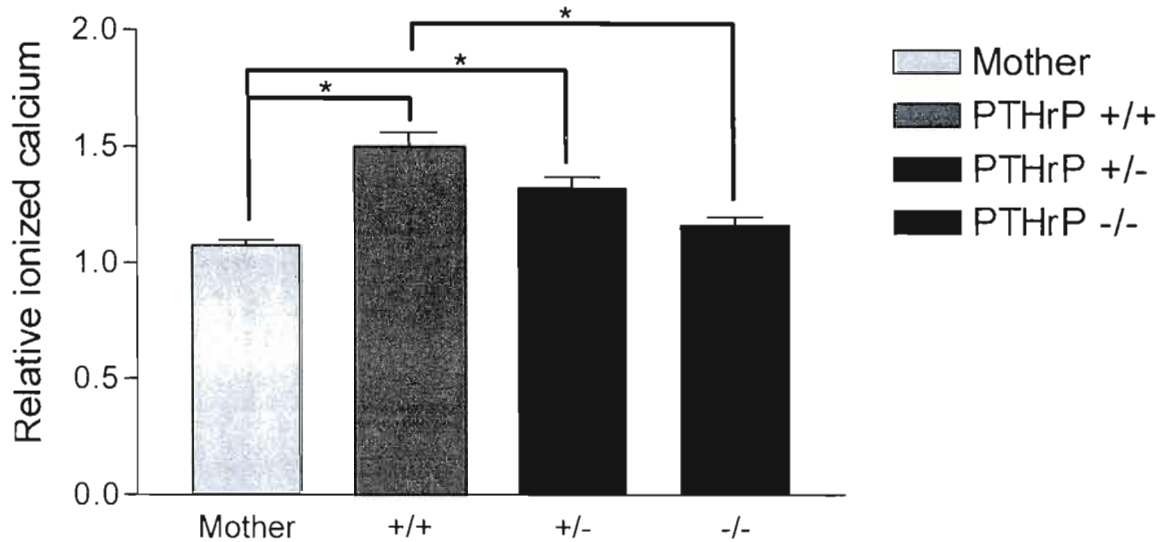
REFERENCES

1. Bass, J.K. and G.M. Chan, *Calcium nutrition and metabolism during infancy*. Nutrition, 2006. **22**(10): p. 1057-66.
2. Brown, E.M., *Extracellular Ca²⁺ sensing, regulation of parathyroid cell function, and role of Ca²⁺ and other ions as extracellular (first) messengers*. Physiol Rev, 1991. **71**(2): p. 371-411.
3. Clapham, D.E., *Calcium signaling*. Cell, 1995. **80**(2): p. 259-68.
4. Berridge, M.J., P. Lipp, and M.D. Bootman, *The versatility and universality of calcium signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. **1**(1): p. 11-21.
5. Pitkin, R.M., *Calcium metabolism in pregnancy and the perinatal period: a review*. Am J Obstet Gynecol, 1985. **151**(1): p. 99-109.
6. Comar, C.L., M.M. Nold, and R.H. Wasserman, *The influence of amino acids and other organic compounds on the gastrointestinal absorption of calcium 45 and strontium 89 in the rat*. J Nutr, 1956. **59**(3): p. 371-83.
7. Trotter, M. and B.B. Hixon, *Sequential changes in weight, density, and percentage ash weight of human skeletons from an early fetal period through old age*. Anat Rec, 1974. **179**(1): p. 1-18.
8. Tucci, J., et al., *The role of fetal parathyroid hormone-related protein in transplacental calcium transport*. J Mol Endocrinol, 1996. **17**(2): p. 159-64.
9. Lafond, J. and L. Simoneau, *Calcium homeostasis in human placenta: role of calcium-handling proteins*. Int Rev Cytol, 2006. **250**: p. 109-74.
10. Peng, J.B., E.M. Brown, and M.A. Hediger, *Structural conservation of the genes encoding CaT1, CaT2, and related cation channels*. Genomics, 2001. **76**(1-3): p. 99-109.
11. Belkacemi, L., et al., *Calbindin-D9k (CaBP9k) localization and levels of expression in trophoblast cells from human term placenta*. Cell Tissue Res, 2004. **315**(1): p. 107-17.
12. Nikitenko, L., et al., *Immunocytochemical and In situ hybridization studies of the distribution of calbindin D9k in the bovine placenta throughout pregnancy*. J Histochem Cytochem, 1998. **46**(5): p. 679-88.
13. Kovacs, C.S., et al., *Calcitropic gene expression suggests a role for the intraplacental yolk sac in maternal-fetal calcium exchange*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **282**(3): p. E721-32.
14. Belkacemi, L., et al., *Calbindin-D28k (CaBP28k) identification and regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human choriocarcinoma cell line JEG-3*. Mol Cell Endocrinol, 2005. **236**(1-2): p. 31-41.
15. Arcuri, F., et al., *The translationally controlled tumor protein is a novel calcium binding protein of the human placenta and regulates calcium handling in trophoblast cells*. Biol Reprod, 2005. **73**(4): p. 745-51.
16. Lafond, J., M. Leclerc, and M.G. Brunette, *Characterization of calcium transport by basal plasma membranes from human placental syncytiotrophoblast*. J Cell Physiol, 1991. **148**(1): p. 17-23.

17. Strid, H., et al., *ATP dependent Ca²⁺ transport across basal membrane of human syncytiotrophoblast in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction or diabetes*. *Placenta*, 2003. **24**(5): p. 445-52.
18. Cho, C.H., et al., *Partial rescue of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger (NCX1) knock-out mouse by transgenic expression of NCX1*. *Exp Mol Med*, 2003. **35**(2): p. 125-35.
19. Koushik, S.V., et al., *Targeted inactivation of the sodium-calcium exchanger (Ncx1) results in the lack of a heartbeat and abnormal myofibrillar organization*. *Faseb J*, 2001. **15**(7): p. 1209-11.
20. Kovacs, C.S., et al., *Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) regulates fetal-placental calcium transport through a receptor distinct from the PTH/PTHrP receptor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(26): p. 15233-8.
21. Kovacs, C.S., et al., *Fetal parathyroids are not required to maintain placental calcium transport*. *J Clin Invest*, 2001. **107**(8): p. 1007-15.
22. Kovacs, E.M., J. Rigo, Jr., and M. Toth, *[Two successful pregnancies after total thyroidectomy and parathyroidectomy]*. *Orv Hetil*, 2003. **144**(30): p. 1493-5.
23. Kovacs, K., et al., *Comparative study of beta-tricalcium phosphate mixed with platelet-rich plasma versus beta-tricalcium phosphate, a bone substitute material in dentistry*. *Acta Vet Hung*, 2003. **51**(4): p. 475-84.
24. Kovacs, C.S., et al., *The vitamin D receptor is not required for fetal mineral homeostasis or for the regulation of placental calcium transfer in mice*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005. **289**(1): p. E133-44.
25. Kovacs, C.S. and H.M. Kronenberg, *Maternal-fetal calcium and bone metabolism during pregnancy, puerperium, and lactation*. *Endocr Rev*, 1997. **18**(6): p. 832-72.
26. Bernucci, L., et al., *Diverse calcium channel types are present in the human placental syncytiotrophoblast basal membrane*. *Placenta*, 2006. **27**(11-12): p. 1082-95.
27. Suzuki, Y., et al., *The Calcium Channel TRPV6 is Involved in Murine Maternal-Fetal Calcium Transport*. *J Bone Miner Res*, 2008.
28. Fleet, J.C., et al., *Vitamin D-inducible calcium transport and gene expression in three Caco-2 cell lines*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002. **283**(3): p. G618-25.
29. Hoenderop, J.G., et al., *Modulation of renal Ca²⁺ transport protein genes by dietary Ca²⁺ and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in 25-hydroxyvitamin D₃-1alpha-hydroxylase knockout mice*. *Faseb J*, 2002. **16**(11): p. 1398-406.
30. Peng, J.B., et al., *CaT1 expression correlates with tumor grade in prostate cancer*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **282**(3): p. 729-34.
31. Hershberger, M.E. and R.S. Tuan, *Placental 57-kDa Ca(2+)-binding protein: regulation of expression and function in trophoblast calcium transport*. *Dev Biol*, 1998. **199**(1): p. 80-92.
32. Bond, H., et al., *Increased maternofetal calcium flux in parathyroid hormone-related protein-null mice*. *J Physiol*, 2008. **586**(7): p. 2015-25.
33. Belkacemi, L., et al., *Expression of calbindin-D28k (CaBP28k) in trophoblasts from human term placenta*. *Biol Reprod*, 2003. **68**(6): p. 1943-50.
34. Care, A.D., et al., *The effect of fetal thyroparathyroidectomy on the transport of calcium across the ovine placenta to the fetus*. *Placenta*, 1986. **7**(5): p. 417-24.

35. Abbas, S.K., et al., *Stimulation of ovine placental calcium transport by purified natural and recombinant parathyroid hormone-related protein (PTHrP) preparations*. Q J Exp Physiol, 1989. **74**(4): p. 549-52.
36. Howard, A., S. Legon, and J.R. Walters, *Plasma membrane calcium pump expression in human placenta and small intestine*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. **183**(2): p. 499-505.
37. Strid, H., et al., *Parathyroid hormone-related peptide (38-94) amide stimulates ATP-dependent calcium transport in the Basal plasma membrane of the human syncytiotrophoblast*. J Endocrinol, 2002. **175**(2): p. 517-24.
38. Strid, H. and T.L. Powell, *ATP-dependent Ca²⁺ transport is up-regulated during third trimester in human syncytiotrophoblast basal membranes*. Pediatr Res, 2000. **48**(1): p. 58-63.
39. Kamath, S.G., N. Haider, and C.H. Smith, *ATP independent calcium transport and binding by basal plasma membrane of human placenta*. Placenta, 1994. **15**(2): p. 147-55.
40. Moreau, R., et al., *Expression and role of calcium-ATPase pump and sodium-calcium exchanger in differentiated trophoblasts from human term placenta*. Mol Reprod Dev, 2003. **65**(3): p. 283-8.

A)



B)

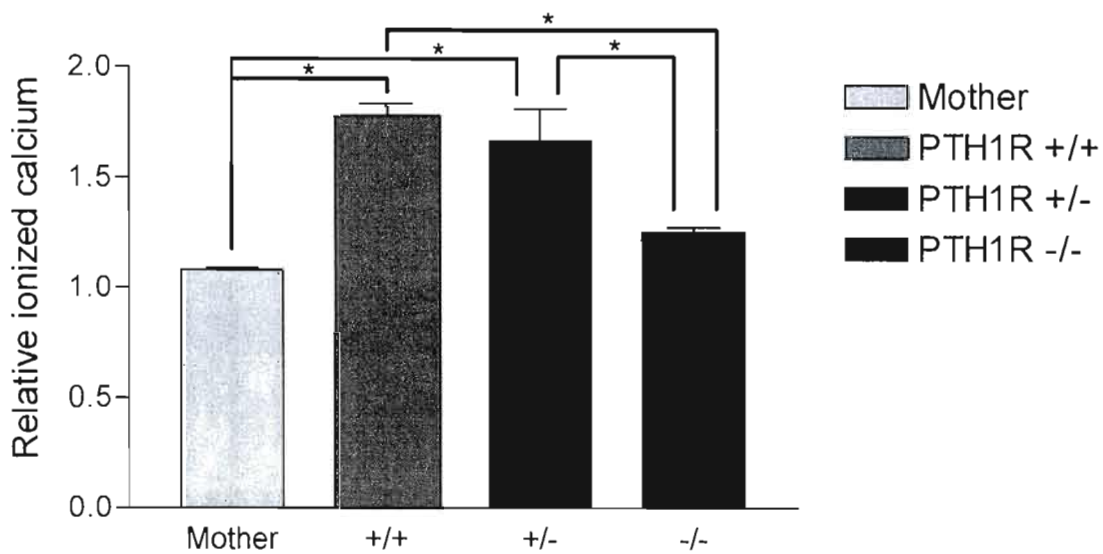


FIGURE 2.2

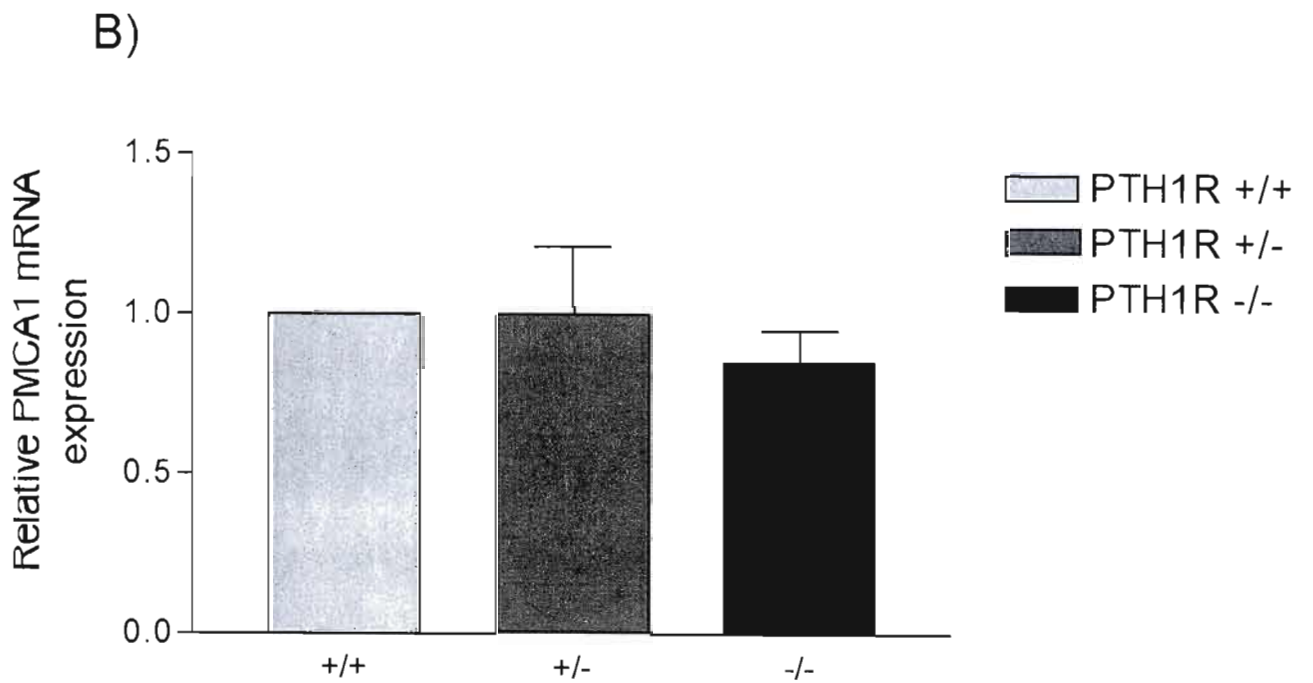
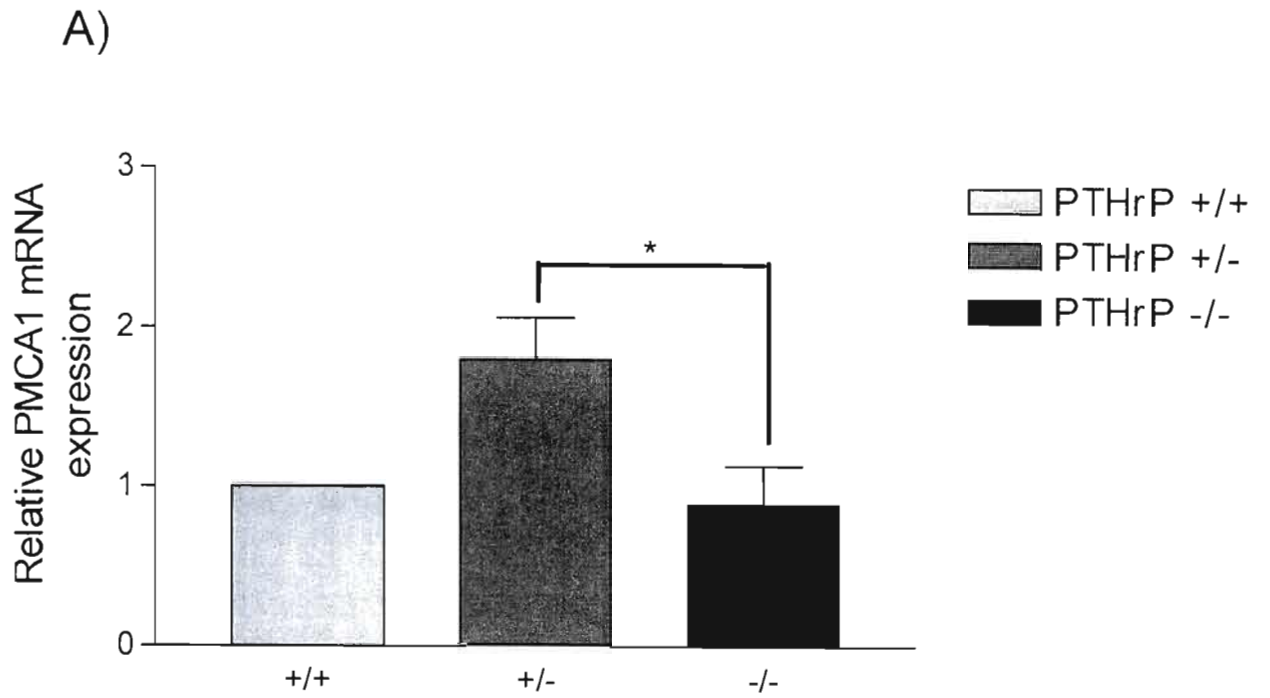


FIGURE 2.3

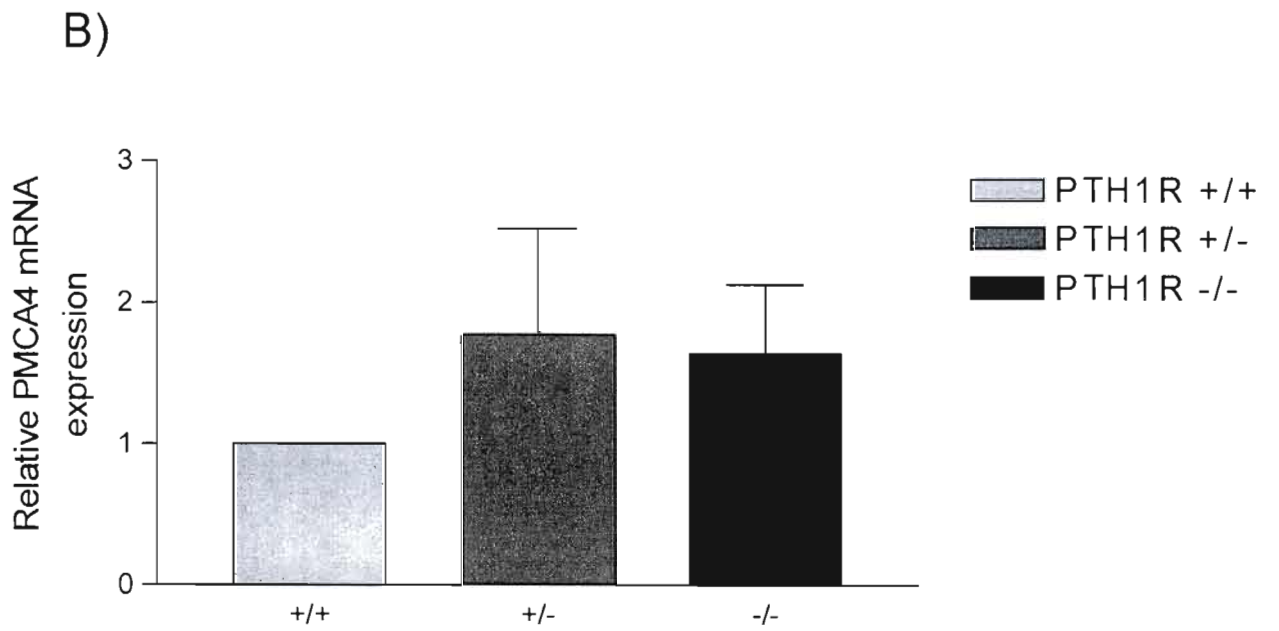
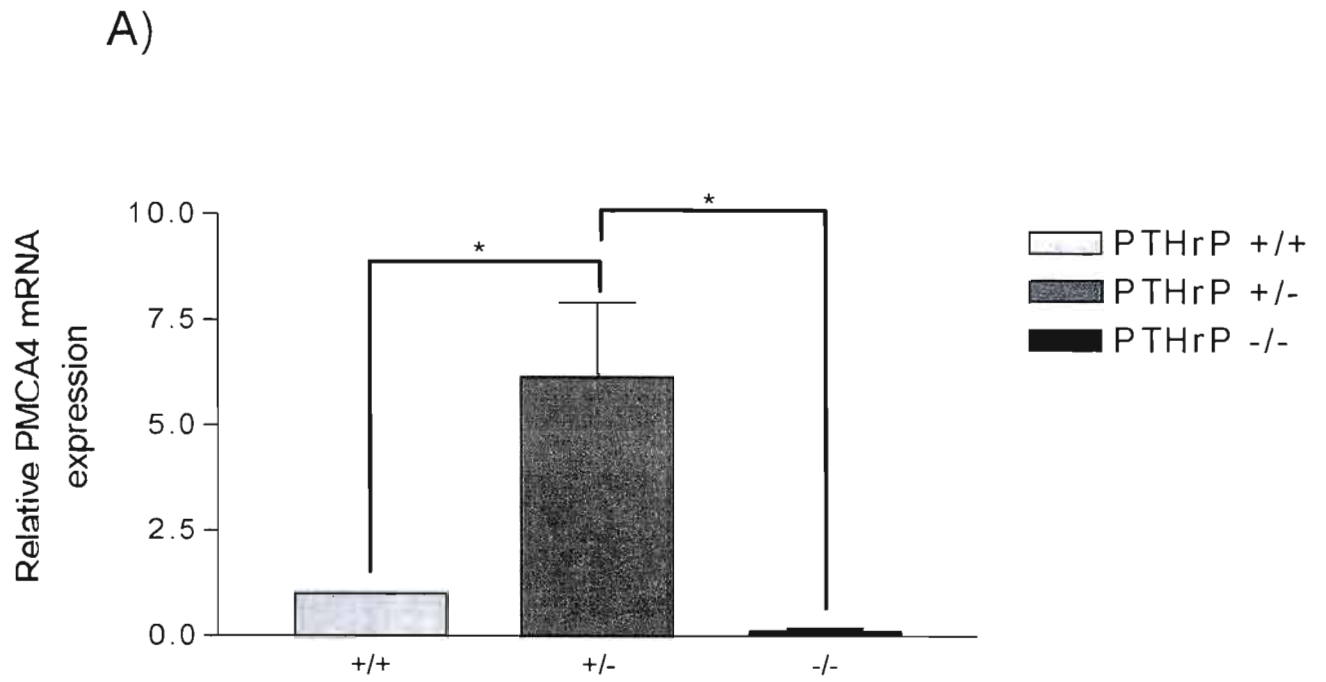


FIGURE 2.4

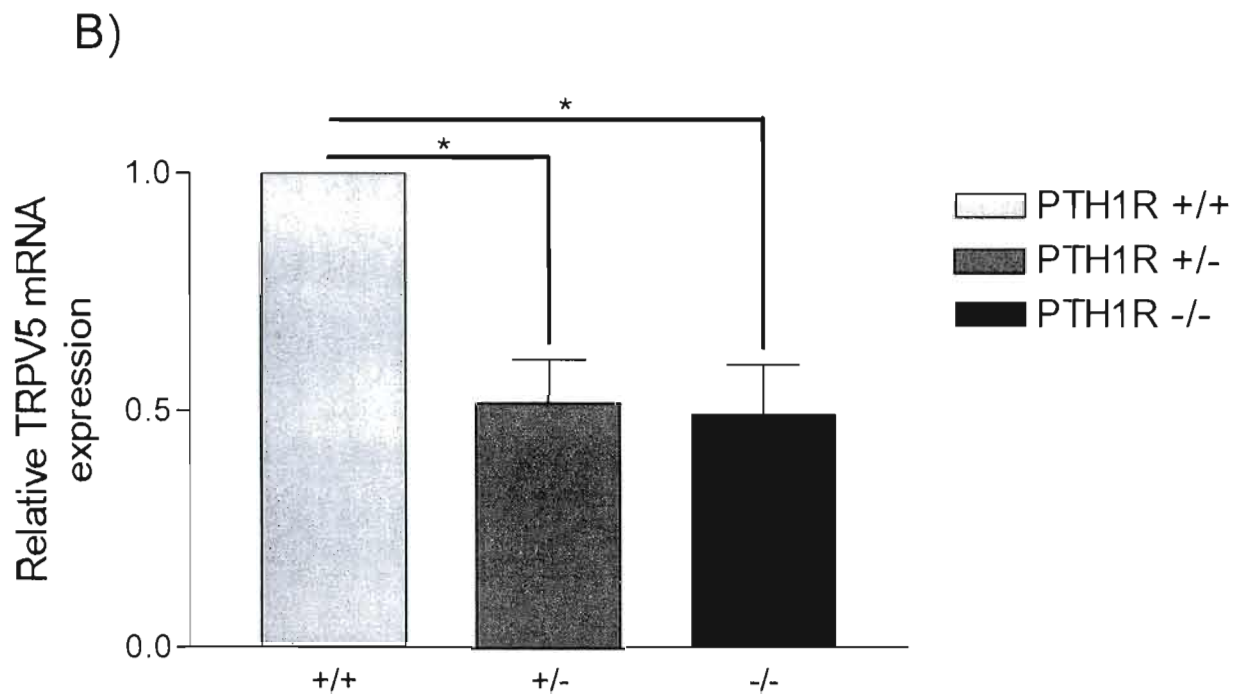
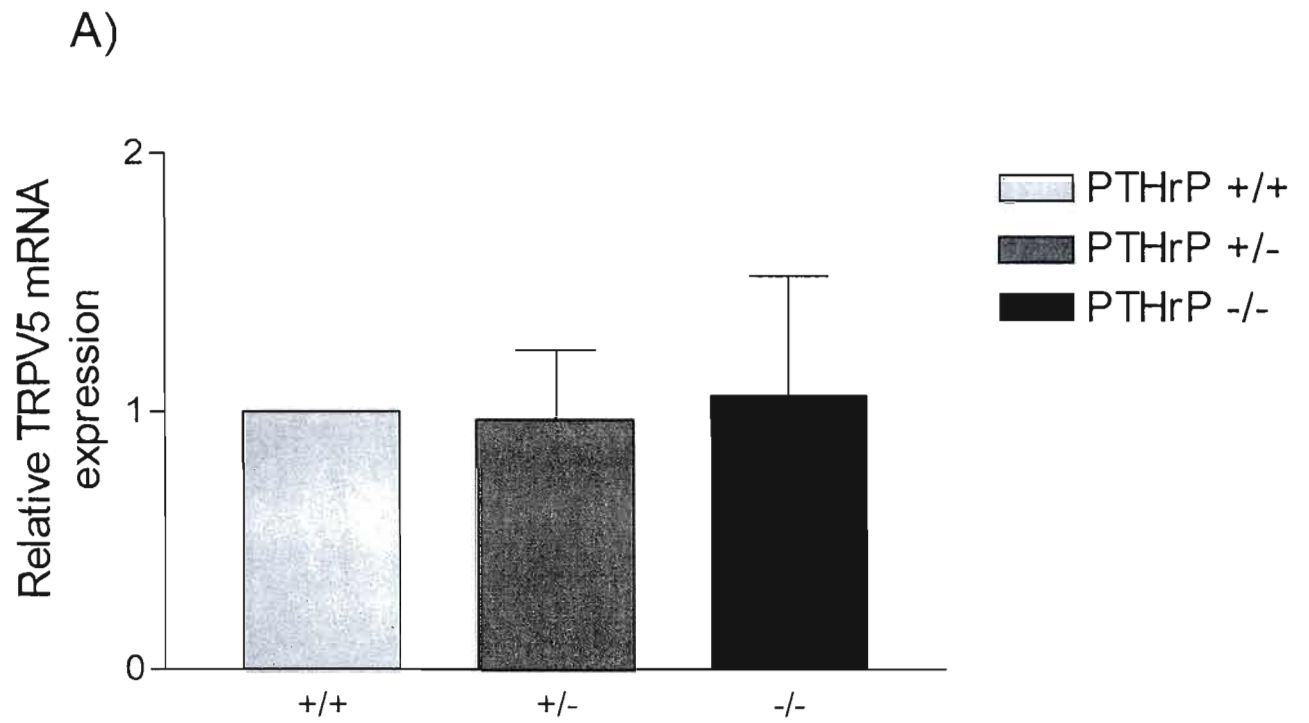
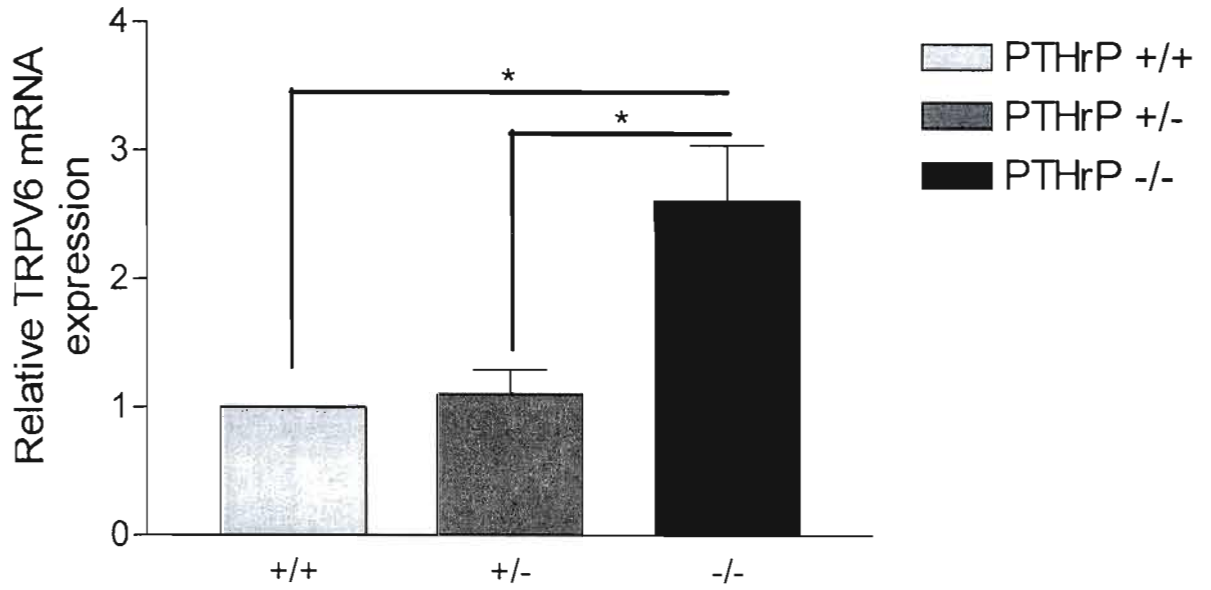


FIGURE 2.5

A)



B)

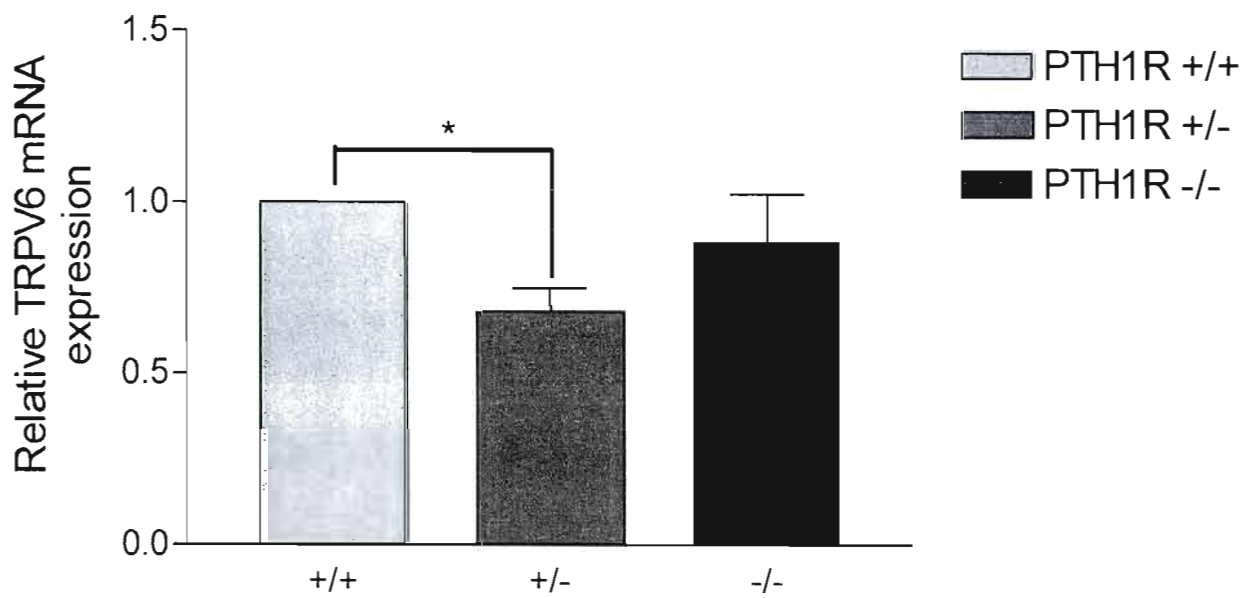


FIGURE 2.6

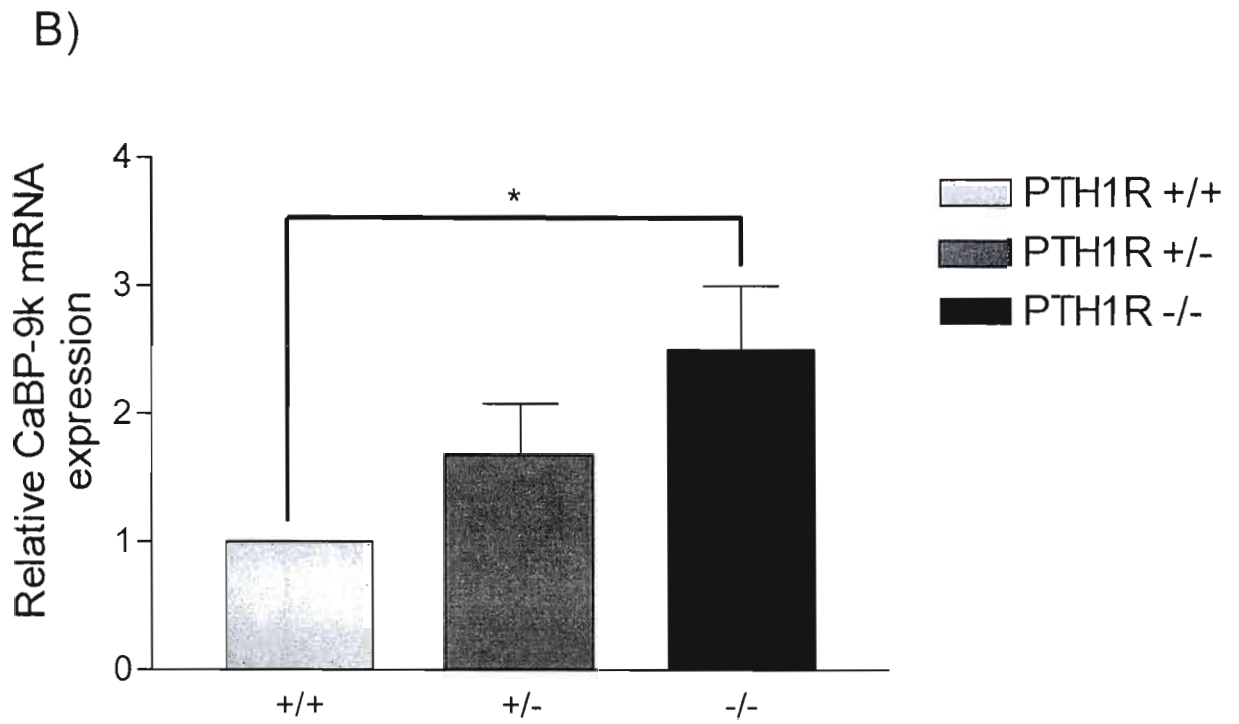
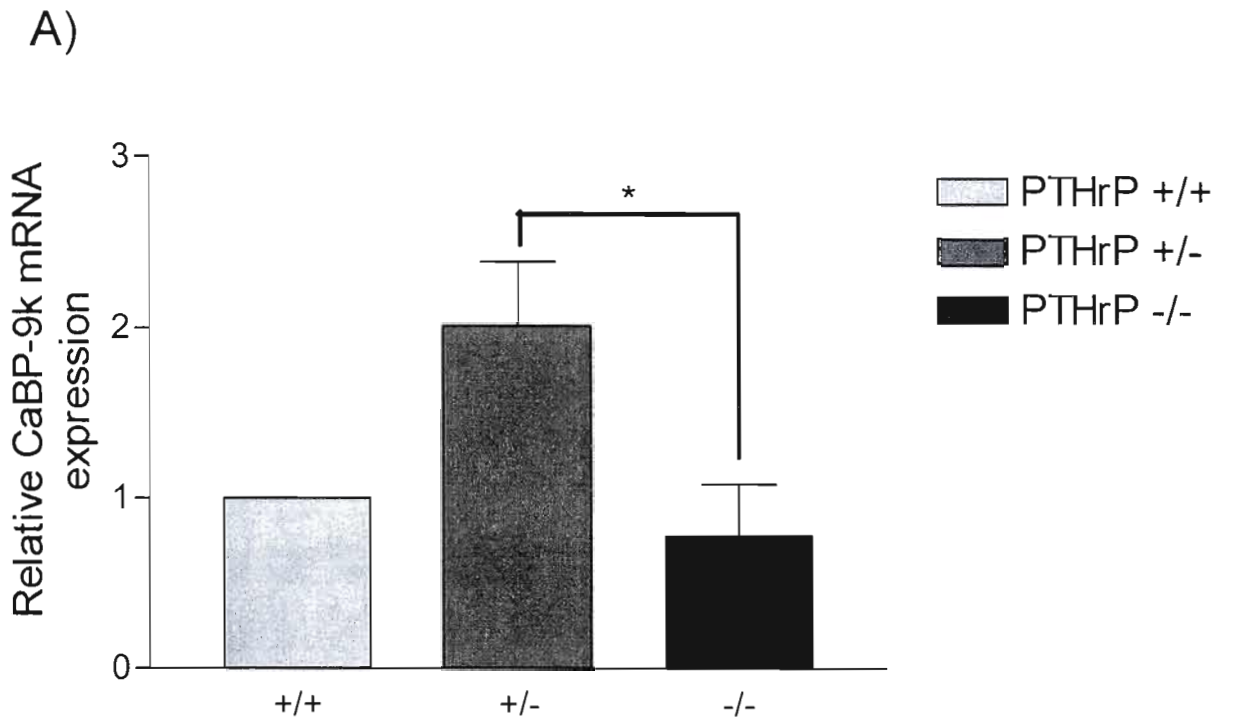


FIGURE 2.8

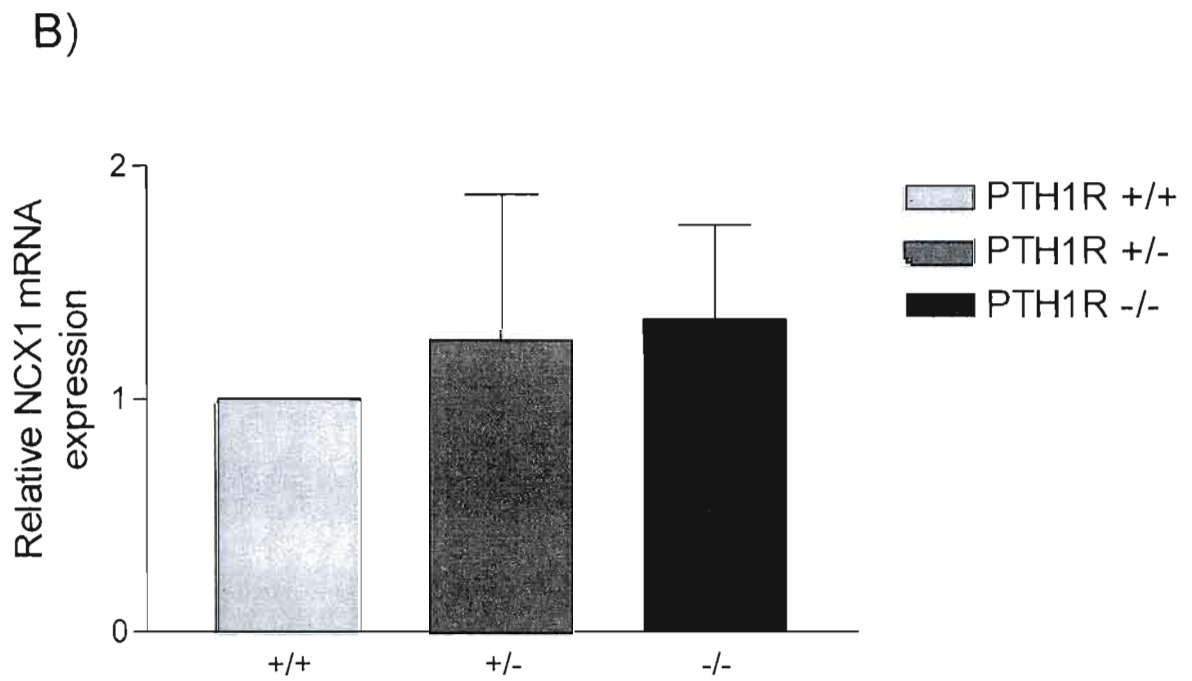
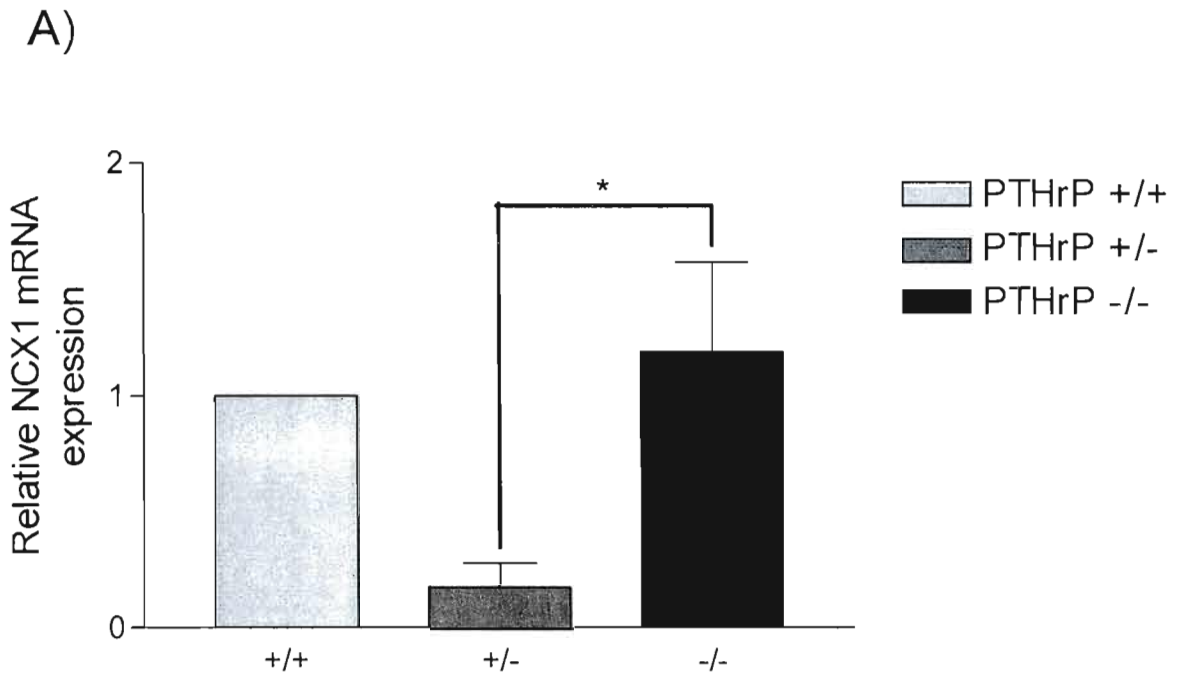


FIGURE 2.7

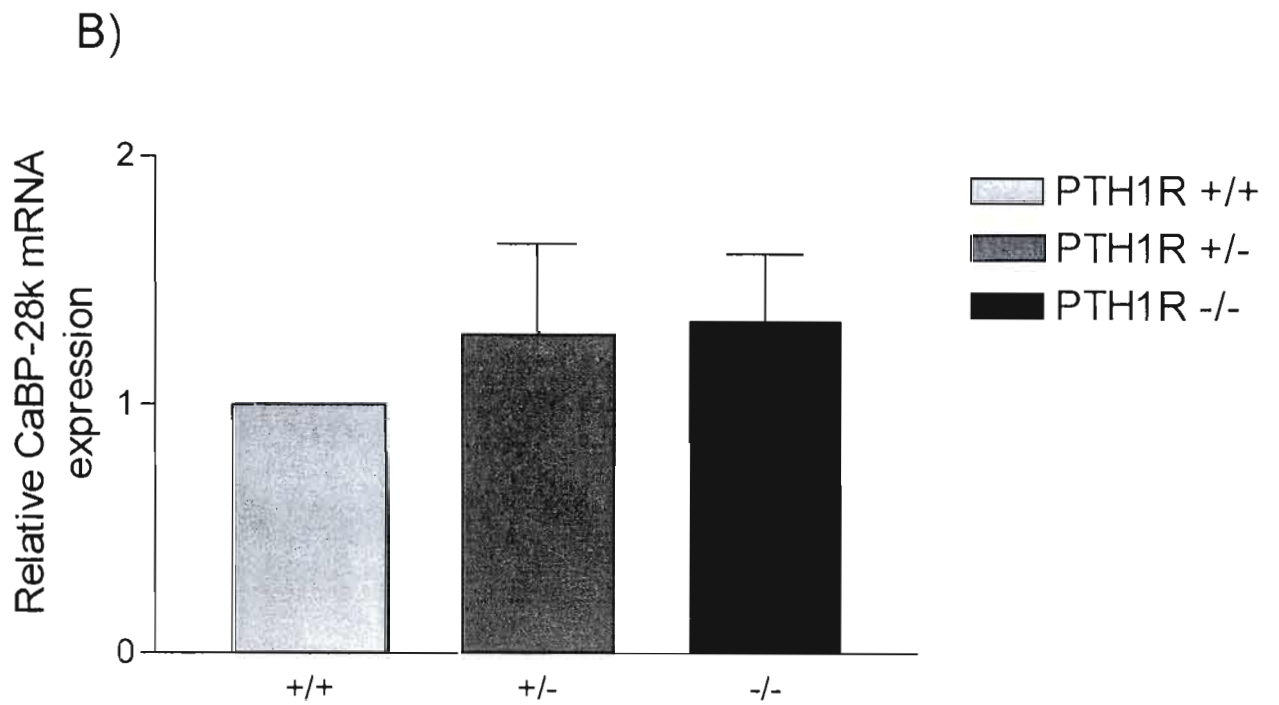
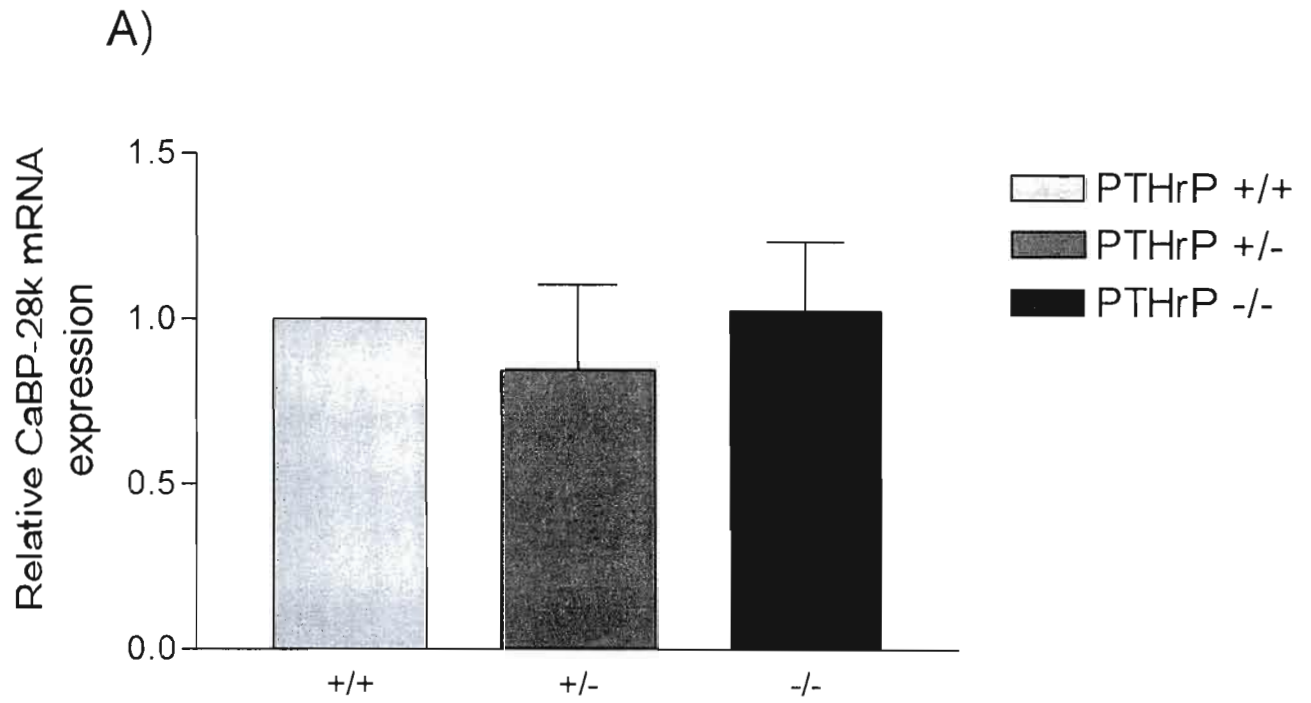


FIGURE 2.9

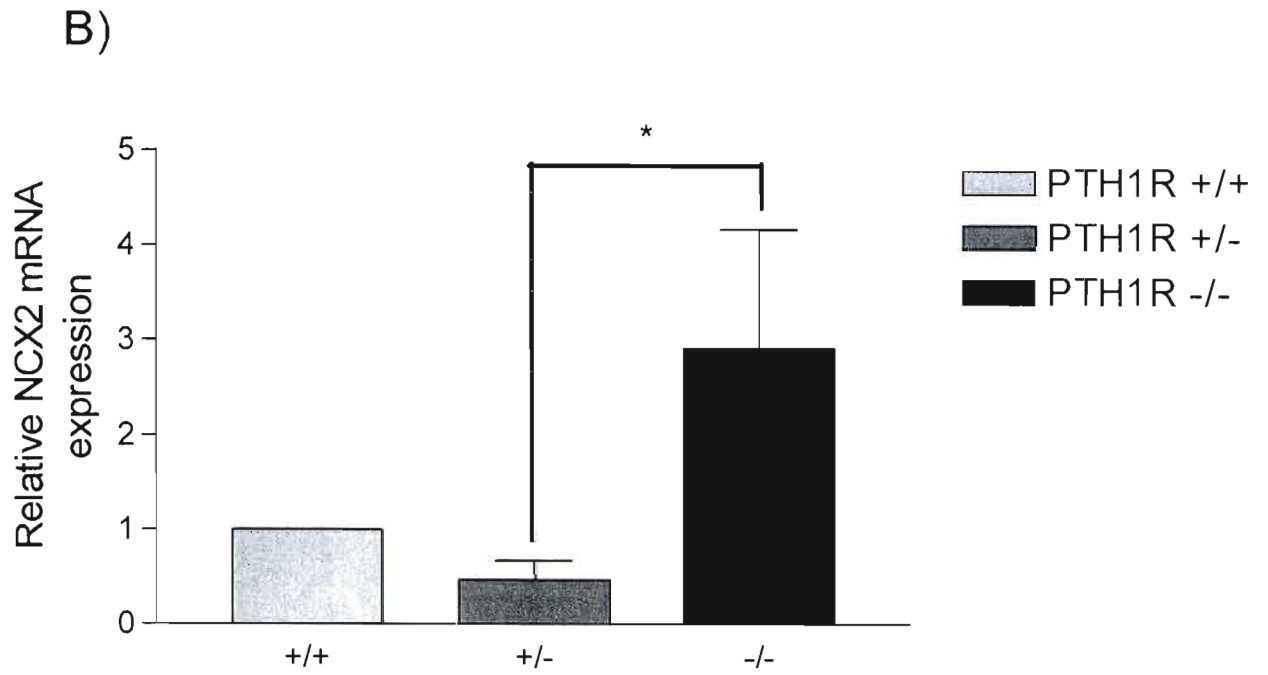
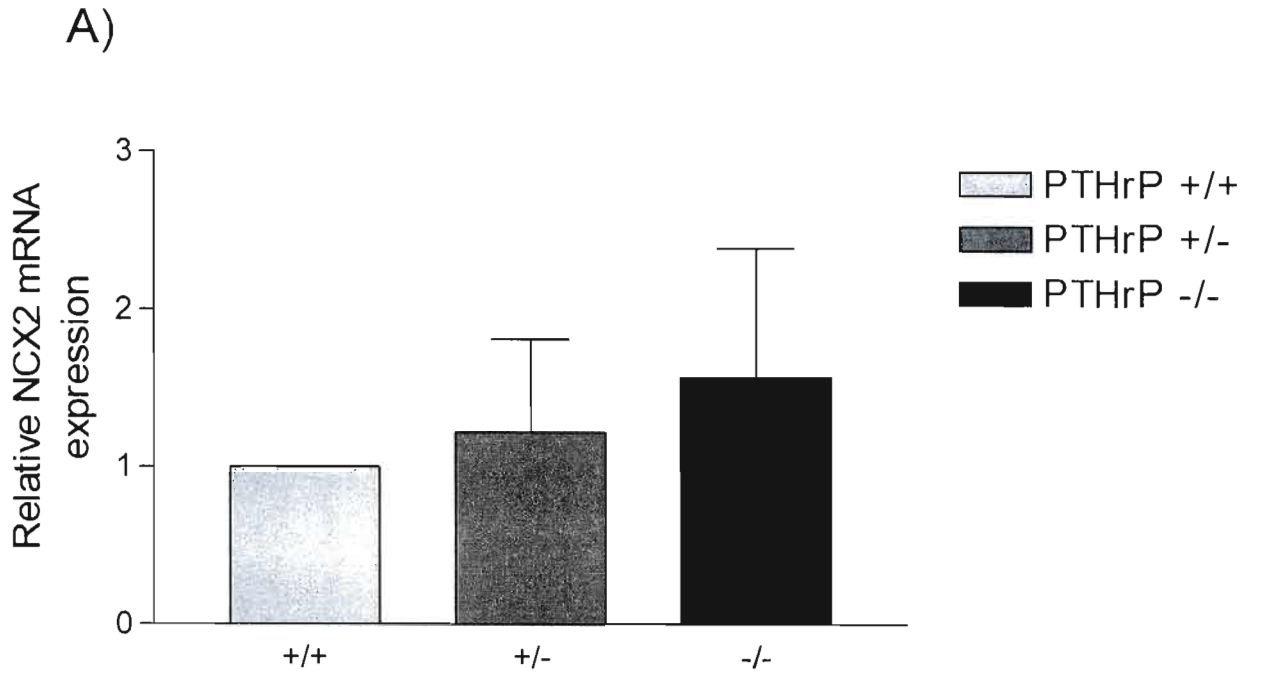


FIGURE 2.10

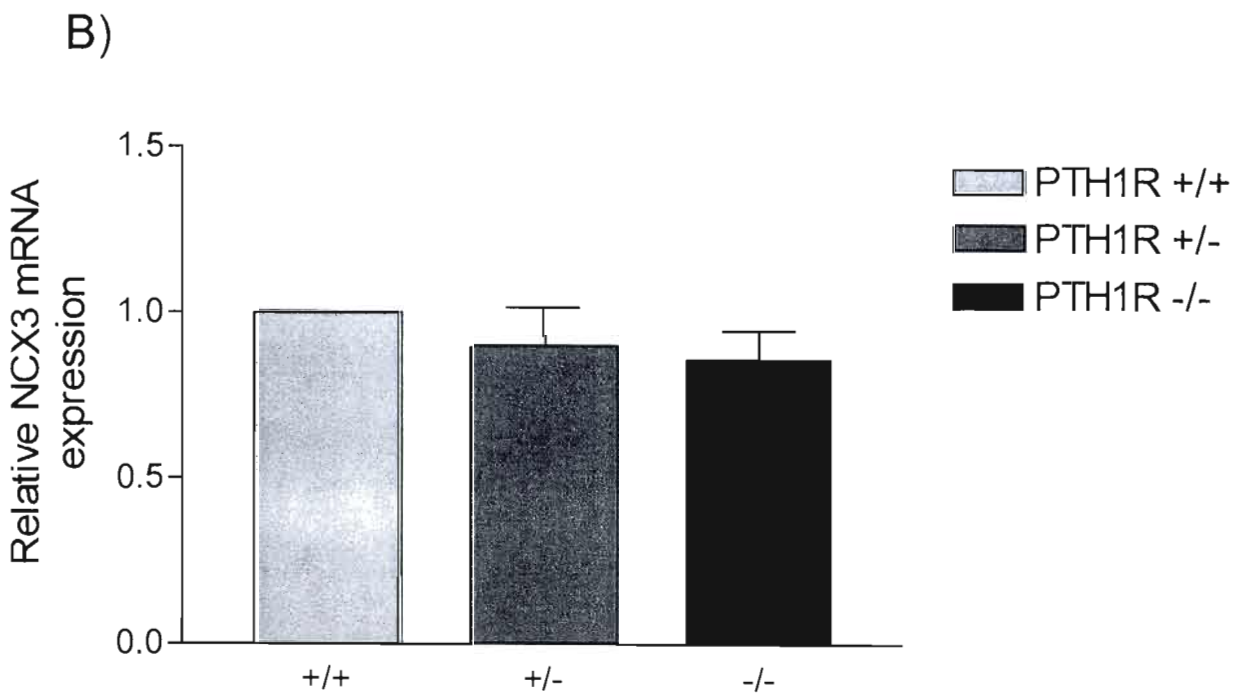
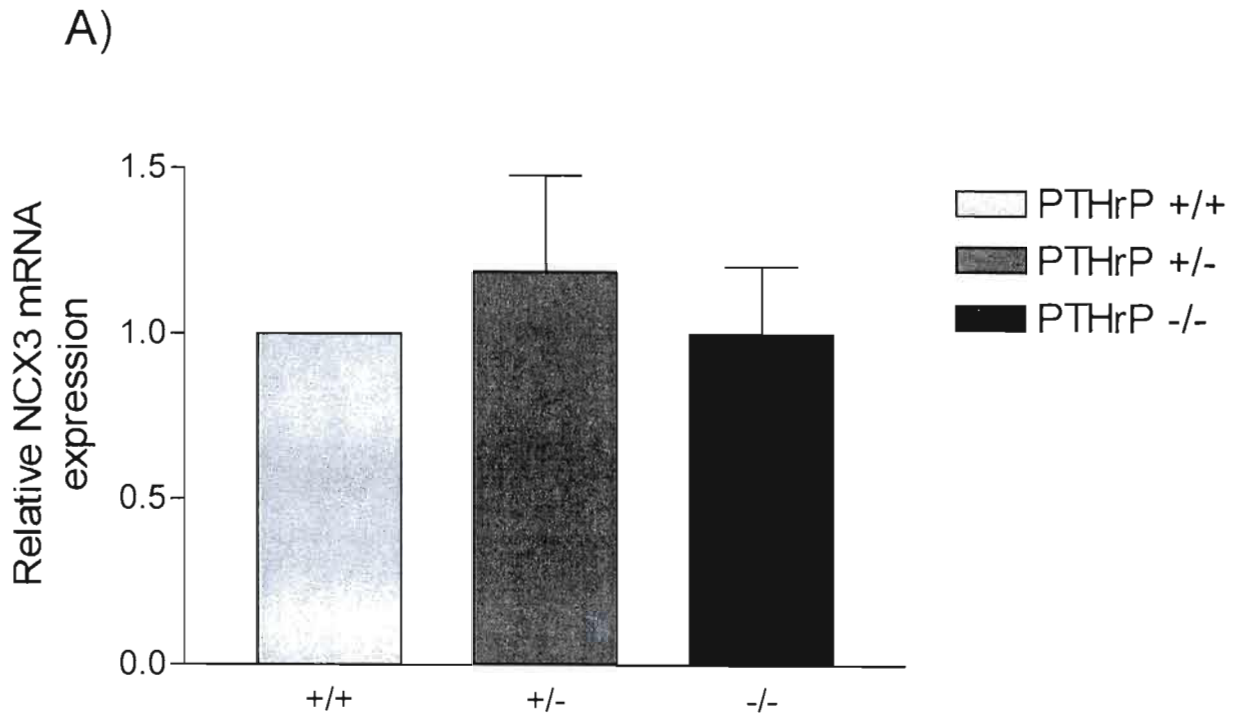
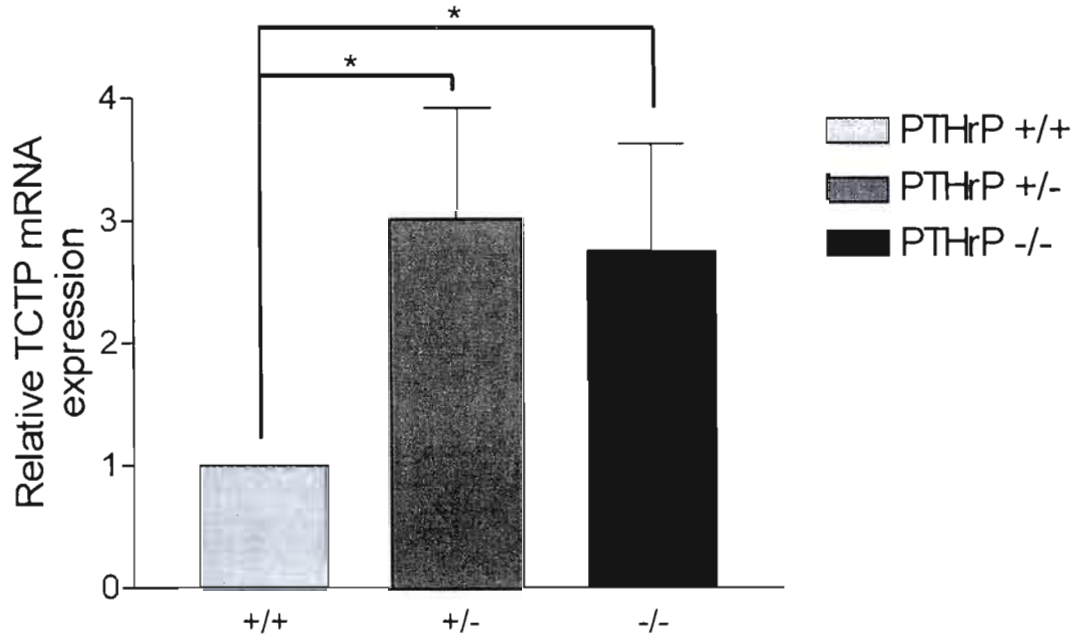


FIGURE 2.11

A)



B)

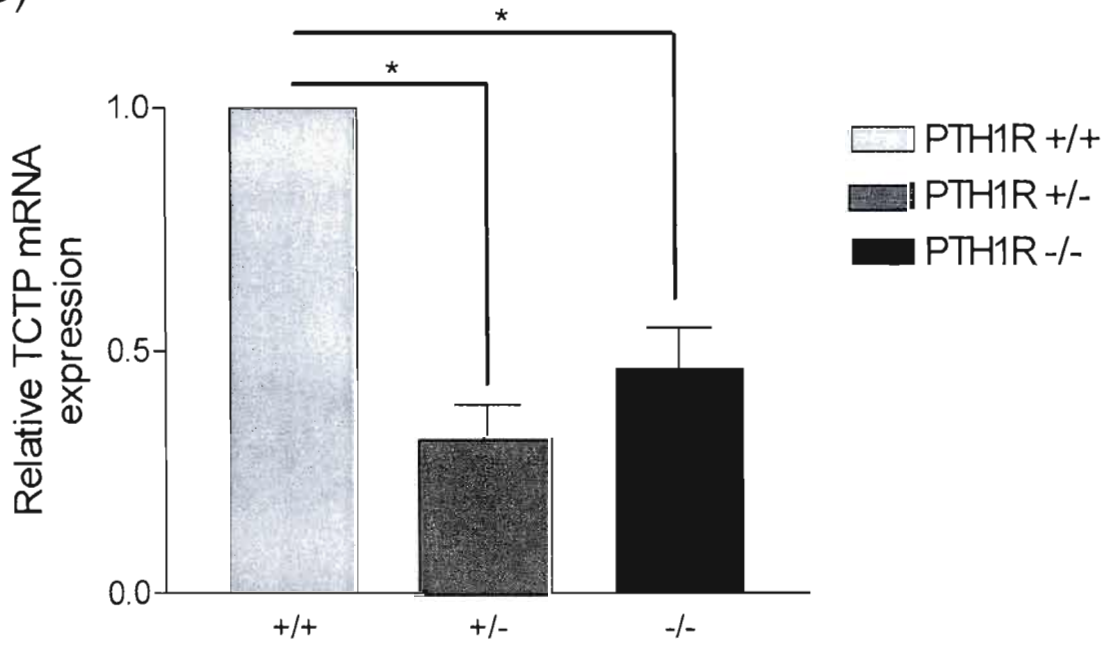


FIGURE 2.12

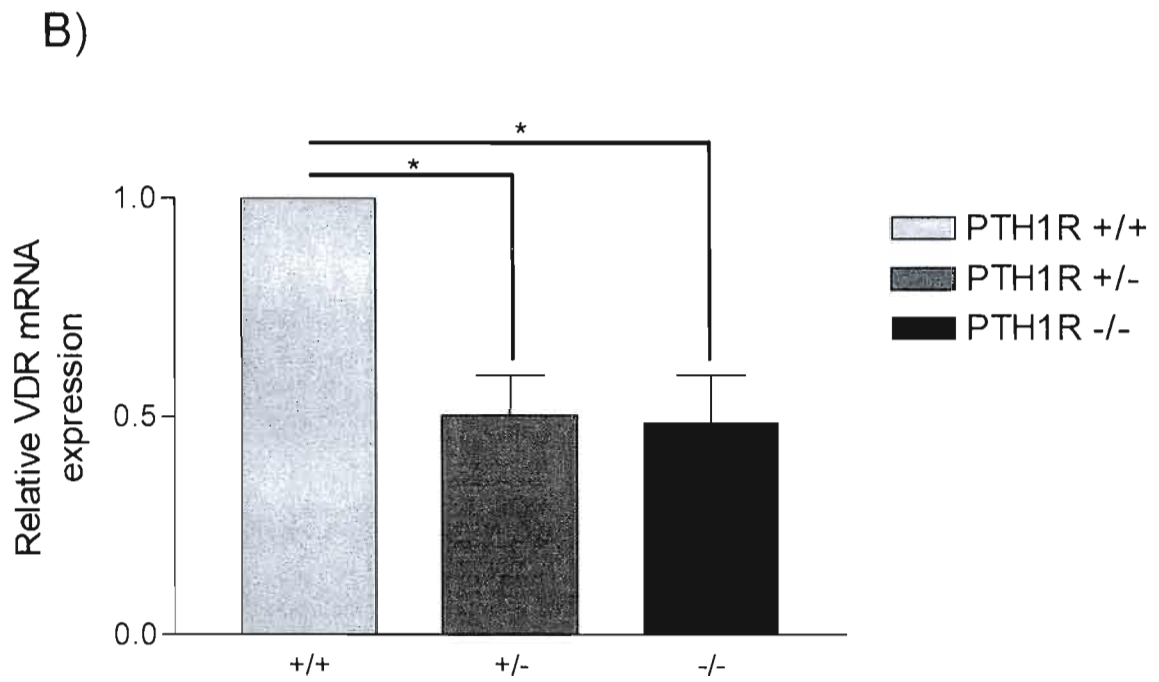
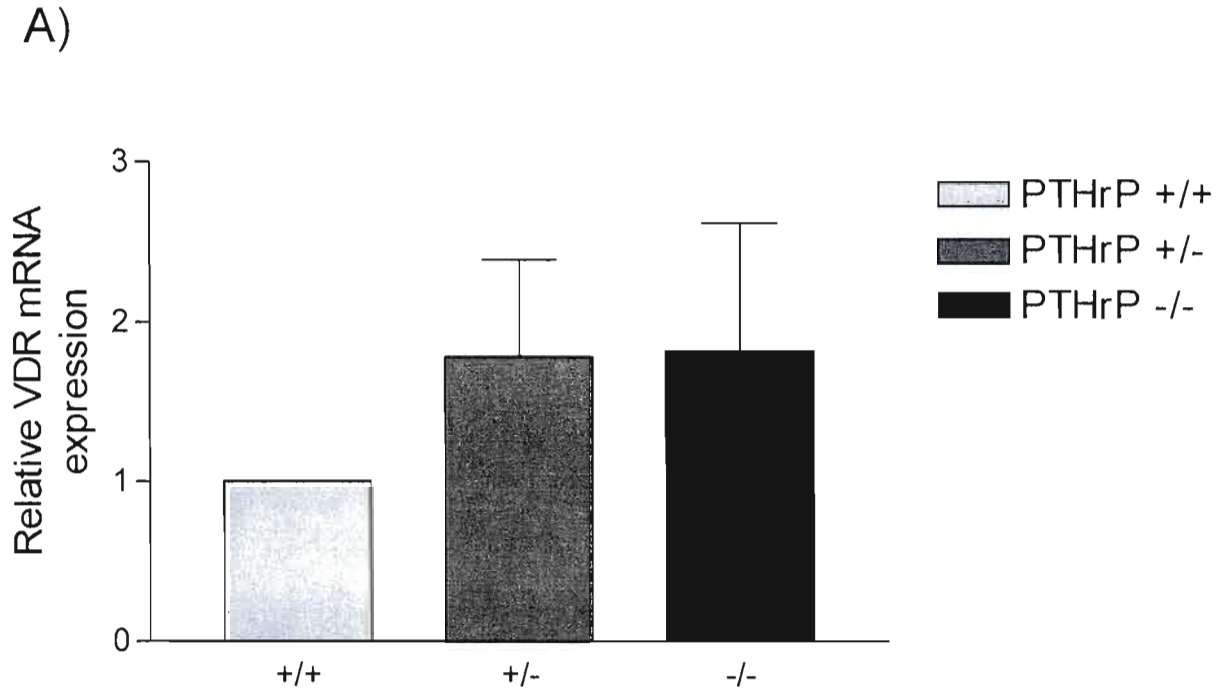
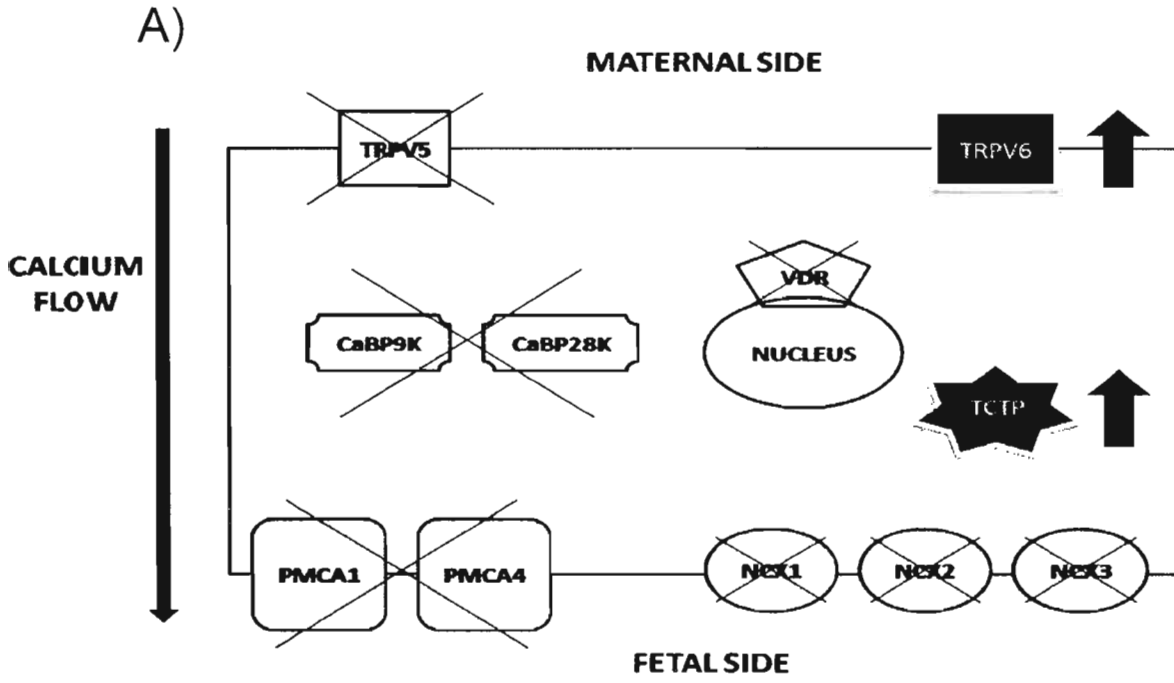
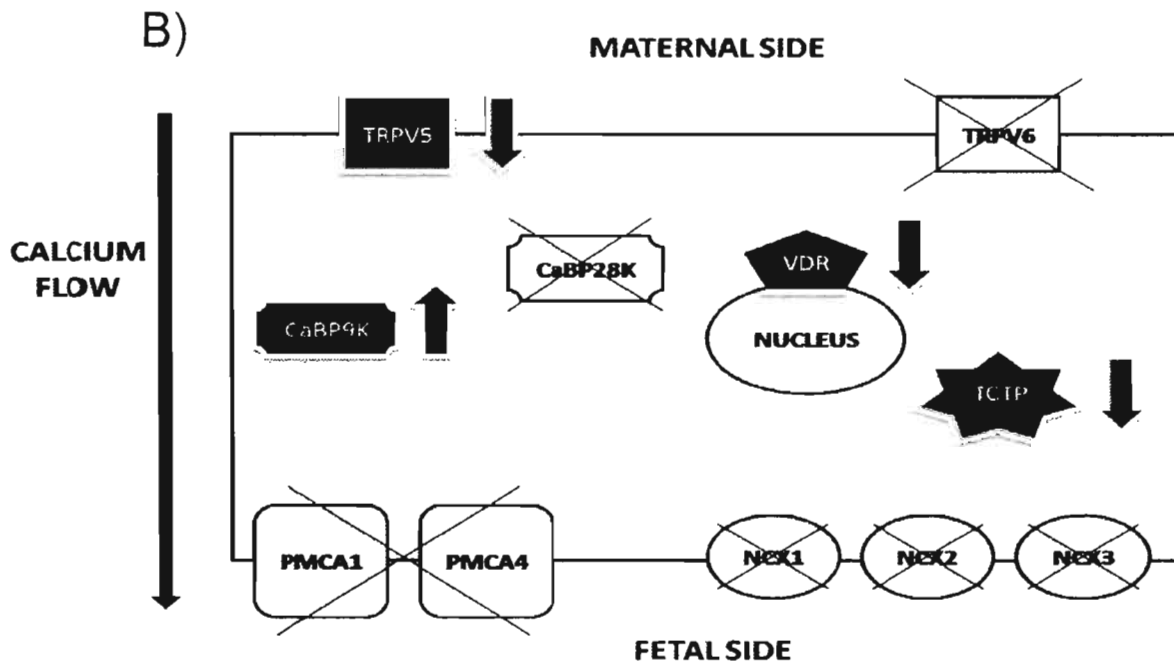


FIGURE 2.13

KO PTHRP



KO PTH1R



CHAPITRE III

CONCLUSION

Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet sont quelque peu surprenants et intéressants en ce qui a trait la manière dont les protéines de manutention du calcium se sont comportées lors d'une délétion en PTHrP ou en PTH1R. Comme il a été précédemment démontré, la PTHrP est connue pour être un régulateur de calcium placentaire et nous nous attendions à un scénario plutôt différent concernant l'expression des gènes calciotropiques [15, 26, 203, 204].

Dans le modèle résumé démontrant une délétion en PTHrP (figure 3.1a), nous constatons que le placenta tente de faire augmenter l'intrusion du calcium en surexprimant le TRV6. Cette hausse de calcium semble être prise en charge par le TCTP également régulé à la hausse. Toutefois, la membrane placentaire faisant face à la circulation fœtale et contenant les protéines responsables de l'extrusion (PMCA et NCX) du calcium, ne réagit pas. L'état hypocalcémique des fœtus (délétés en PTHrP ou PTH1R) s'expliquerait peut-être par l'absence de régulation, quelle soit positive ou négative, des PMCA et NCX. Cela fut impressionnant comme résultat sachant qu'il est connu que les PMCA et les NCX sont retrouvés dans le placenta durant le dernier tiers et que ceux-ci sont impliqués dans le maintien de l'homéostasie du calcium [120-122, 128, 185]. Malgré que l'expression des protéines de manutention du calcium responsables de l'extrusion du calcium ne soit pas modifiée, cela ne doit pas laisser sous entendre que celle-ci ne soient pas fonctionnelles ou bien qu'elles ne contribuent pas au transport de calcium.

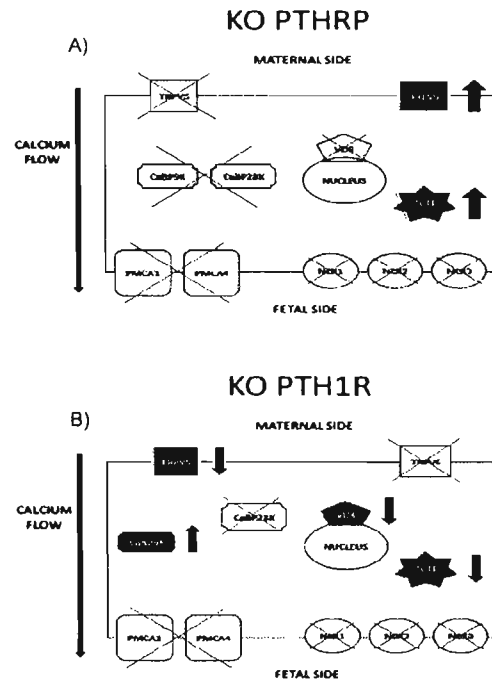


Figure 3.1 Vue d'ensemble de l'effet d'une délétion en a) PTHrP et en b) PTH1R sur le niveau d'expression des ARNm des protéines de manutention du calcium présentes dans le placenta de souris. Seulement la comparaison entre les placentas wild-type et KO a été schématisée. Une flèche vers le haut représente une régulation à la hausse et une flèche vers le bas une régulation à la baisse. Un « X » montre aucune variation significative de l'expression.

Dans le modèle résumé démontrant la délétion du PTH1R (Figure 3.1), la membrane du placenta faisant face à la circulation fœtale semble se comporter de la même façon que celle du modèle délété en PTHrP. Aucun des canaux ou échangeurs responsables de l'extrusion du calcium n'a été régulé à la hausse ou à la baisse. Encore une fois, le placenta ne semble pas vouloir réagir à l'état hypocalcémique dans lequel se trouve le fœtus en augmentant l'expression de protéines de manutention du calcium en charge de l'expulsion du calcium. Seule l'expression de la CaBP-9k s'est vue augmenter suite à la délétion du récepteur. À ce point, plusieurs questions s'imposent. Est-ce que le placenta compense cette entrée de calcium par une autre voie de signalisation? La CaBP-9k réagit certainement à une hausse en calcium intracellulaire. S'il y a augmentation du niveau de calcium intracellulaire, comment expliquons-nous la régulation à la baisse de VDR, de TCTP et

qu'aucune variation dans l'expression de CaBP-28k ne soit mesurée? De plus, si le placenta fait augmenter l'entrée de calcium dans le milieu intracellulaire, pourquoi l'expression de TRPV6 n'augmente-t-elle pas et pourquoi l'expression de TRPV5 est-elle réduite?

En conclusion, la délétion de la PTHrP modifie légèrement le niveau d'expression des protéines de manutention du calcium dans le placenta de souris. Dans ce modèle, seule la TRPV6 et le TCTP sont régulés à la hausse et pourraient contribuer en partie à faire pénétrer le calcium dans le placenta. Si augmentation il y a, le placenta est toujours incapable d'évacuer adéquatement le calcium dans la circulation fœtale. Comme pour l'hormone, l'altération du récepteur PTH1R réduit également le transport de calcium. L'effet d'une délétion du PTH1R exerce toutefois un impact plus impressionnant sur les gènes impliqués dans l'homéostasie du calcium. Le TRPV5, le VDR et le TCTP se sont vus réguler à la baisse contrairement à une élévation plutôt contradictoire de la CaBP-9k. Cette recherche a permis de confirmer encore une fois l'importance de la PTHrP et de son récepteur PTH1R dans le maintien de l'équilibre calcique placentaire. Leur effet régulateur sur les différentes protéines de manutention du calcium reste encore à éclaircir. Notre équipe de recherche tente actuellement d'évaluer le profil protéique des différentes protéines de manutention du calcium retrouvées dans les placentas utilisés par la présente étude. L'évaluation de l'expression protéique nous permettra de faire des corrélations entre ARNm et protéines et ainsi de mieux comprendre la réelle implication de la PTHrP dans les échanges placentaires.

HYPOTHÈSES ET PERSPECTIVES

Suite aux résultats obtenus, nous sommes toujours convaincu du fait que la PTHrP et le PTH1R sont essentiels au maintien de l'équilibre calcique entre la mère et son fœtus. De plus, ces travaux de recherche ont permis de mieux comprendre l'implication de la PTHrP et de son récepteur envers les différentes protéines de manutention du calcium présentes dans le placenta. D'un point de vue d'ensemble, nous croyons que la PTHrP serait l'unique régulateur des protéines de manutention responsable de l'extrusion du calcium (ex : PMCA

et NCX) vers la circulation fœtale. Les protéines de manutention chargées de l'intrusion du calcium pourraient, quant à eux, être également sous le contrôle de la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ et de la PTH lors d'une délétion en PTHrP ou PTH1R. Plus précisément, lors d'une dysfonction en PTHrP, la barrière placentaire reçoit le signal que leur principal régulateur est absent et que la voie compensatrice doit être suscitée, celle de la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ ou même de la PTH. La $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ ou la PTH seraient donc responsables de l'augmentation de l'expression des ARNm de TRPV6. Lors d'une dysfonction en PTH1R, celui-ci n'est pas fonctionnel et la voie de la PTH ne peut être une alternative possible. La $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ serait donc en charge de faire diminuer l'expression des ARNm de TRPV5 dans le but de ralentir l'entrée de calcium qui ne peut être expulsé adéquatement dans la circulation fœtale. Comme il a été mentionné dans l'article scientifique, lors d'un KO en PTH1R, l'entrée de calcium dans le placenta est rendu possible grâce à des canaux et ou récepteurs ainsi qu'une voie de signalisation encore inconnues. En ce qui a trait aux PMCA et NCX, l'expression de leurs ARNm ne peut être régulée par une voie autre que celle de la PTHrP et ou PTH1R. N'étant plus modulés par leur effecteur, le calcium réussi à franchir la barrière placentaire mais à un niveau insuffisant pour le fœtus. Sans aucun doute le niveau d'expression protéique ainsi que l'activité des différentes protéines de manutention du calcium devraient être mesurés. Des modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles pourraient empêcher l'expression de certaines protéines ou bien les rendre tout simplement non fonctionnelles (ex : l'expression des ARNm de TRPV6 augmente dans les placentas KO en PTHrP mais des modifications post-traductionnelles pourraient altérer sa fonctionnalité). Il serait également intéressant d'analyser les résultats d'expression d'ARNm en fonction de leur niveau d'expression absolu et non par rapport à 1 (niveau relatif). Ceci permettrait de quantifier le niveau d'expression de chacun des transporteurs ou canaux présent dans le placenta. La mesure du niveau d'expression des ARNm et des protéines de la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ ainsi que de la PTH serait également une avenue forte intéressante à explorer. Finalement, il serait d'autant plus pertinent d'évaluer l'activité du PTH1R chez les mutants KO PTHrP. Ceci permettrait de confirmer si la voie signalisation passant par le récepteur PTH1R est active (ex : liaison de la PTH au PTH1R).

RÉFÉRENCES

1. Brown, E.M., *Extracellular Ca²⁺ sensing, regulation of parathyroid cell function, and role of Ca²⁺ and other ions as extracellular (first) messengers*. *Physiol Rev*, 1991. **71**(2): p. 371-411.
2. Bass, J.K. and G.M. Chan, *Calcium nutrition and metabolism during infancy*. *Nutrition*, 2006. **22**(10): p. 1057-66.
3. Clapham, D.E., *Calcium signaling*. *Cell*, 1995. **80**(2): p. 259-68.
4. Berridge, M.J., P. Lipp, and M.D. Bootman, *The versatility and universality of calcium signalling*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000. **1**(1): p. 11-21.
5. Bishop, N.J., et al., *Early diet of preterm infants and bone mineralization at age five years*. *Acta Paediatr*, 1996. **85**(2): p. 230-6.
6. Gale, J.E., et al., *FM1-43 dye behaves as a permeant blocker of the hair-cell mechanotransducer channel*. *J Neurosci*, 2001. **21**(18): p. 7013-25.
7. Tobias, J.H. and C. Cooper, *PTH/PTHrP activity and the programming of skeletal development in utero*. *J Bone Miner Res*, 2004. **19**(2): p. 177-82.
8. Trotter, M. and B.B. Hixon, *Sequential changes in weight, density, and percentage ash weight of human skeletons from an early fetal period through old age*. *Anat Rec*, 1974. **179**(1): p. 1-18.
9. Pitkin, R.M., *Calcium metabolism in pregnancy and the perinatal period: a review*. *Am J Obstet Gynecol*, 1985. **151**(1): p. 99-109.
10. Comar, C.L., M.M. Nold, and R.H. Wasserman, *The influence of amino acids and other organic compounds on the gastrointestinal absorption of calcium 45 and strontium 89 in the rat*. *J Nutr*, 1956. **59**(3): p. 371-83.
11. Lafond, J. and L. Simoneau, *Calcium homeostasis in human placenta: role of calcium-handling proteins*. *Int Rev Cytol*, 2006. **250**: p. 109-74.
12. Peng, J.B., E.M. Brown, and M.A. Hediger, *Structural conservation of the genes encoding CaT1, CaT2, and related cation channels*. *Genomics*, 2001. **76**(1-3): p. 99-109.

13. Belkacemi, L., et al., *Calbindin-D9k (CaBP9k) localization and levels of expression in trophoblast cells from human term placenta*. Cell Tissue Res, 2004. **315**(1): p. 107-17.
14. Nikitenko, L., et al., *Immunocytochemical and In situ hybridization studies of the distribution of calbindin D9k in the bovine placenta throughout pregnancy*. J Histochem Cytochem, 1998. **46**(5): p. 679-88.
15. Kovacs, C.S., et al., *Calcitropic gene expression suggests a role for the intraplacental yolk sac in maternal-fetal calcium exchange*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **282**(3): p. E721-32.
16. Belkacemi, L., et al., *Expression of calbindin-D28k (CaBP28k) in trophoblasts from human term placenta*. Biol Reprod, 2003. **68**(6): p. 1943-50.
17. Belkacemi, L., et al., *Calbindin-D28k (CaBP28k) identification and regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human choriocarcinoma cell line JEG-3*. Mol Cell Endocrinol, 2005. **236**(1-2): p. 31-41.
18. Arcuri, F., et al., *The translationally controlled tumor protein is a novel calcium binding protein of the human placenta and regulates calcium handling in trophoblast cells*. Biol Reprod, 2005. **73**(4): p. 745-51.
19. Lafond, J., M. Leclerc, and M.G. Brunette, *Characterization of calcium transport by basal plasma membranes from human placental syncytiotrophoblast*. J Cell Physiol, 1991. **148**(1): p. 17-23.
20. Strid, H., et al., *ATP dependent Ca²⁺ transport across basal membrane of human syncytiotrophoblast in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction or diabetes*. Placenta, 2003. **24**(5): p. 445-52.
21. Cho, C.H., et al., *The Na⁺-Ca²⁺ exchanger is essential for embryonic heart development in mice*. Mol Cells, 2000. **10**(6): p. 712-22.
22. Cho, C.H., et al., *Partial rescue of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger (NCX1) knock-out mouse by transgenic expression of NCX1*. Exp Mol Med, 2003. **35**(2): p. 125-35.

23. Koushik, S.V., et al., *Targeted inactivation of the sodium-calcium exchanger (Ncx1) results in the lack of a heartbeat and abnormal myofibrillar organization*. *Faseb J*, 2001. **15**(7): p. 1209-11.
24. Tucci, J., et al., *The role of fetal parathyroid hormone-related protein in transplacental calcium transport*. *J Mol Endocrinol*, 1996. **17**(2): p. 159-64.
25. Miao, D., et al., *Parathyroid hormone is essential for normal fetal bone formation*. *J Clin Invest*, 2002. **109**(9): p. 1173-82.
26. Kovacs, C.S., et al., *Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) regulates fetal-placental calcium transport through a receptor distinct from the PTH/PTHrP receptor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(26): p. 15233-8.
27. Kovacs, C.S., et al., *Fetal parathyroids are not required to maintain placental calcium transport*. *J Clin Invest*, 2001. **107**(8): p. 1007-15.
28. Rossant, J. and J.C. Cross, *Placental development: lessons from mouse mutants*. *Nat Rev Genet*, 2001. **2**(7): p. 538-48.
29. Ramsey, J.C., *Nonlinear pharmacokinetics relative to toxicity and use of toxicological data*. *Drug Metab Rev*, 1982. **13**(5): p. 779-97.
30. Cross, J.C., D.G. Simmons, and E.D. Watson, *Chorioallantoic morphogenesis and formation of the placental villous tree*. *Ann N Y Acad Sci*, 2003. **995**: p. 84-93.
31. Knofler, M., R. Vasicek, and M. Schreiber, *Key regulatory transcription factors involved in placental trophoblast development--a review*. *Placenta*, 2001. **22 Suppl A**: p. S83-92.
32. Leiser, R. and P. Kaufmann, *Placental structure: in a comparative aspect*. *Exp Clin Endocrinol*, 1994. **102**(3): p. 122-34.
33. Wulff, C., et al., *Hemochorial placentation in the primate: expression of vascular endothelial growth factor, angiopoietins, and their receptors throughout pregnancy*. *Biol Reprod*, 2002. **66**(3): p. 802-12.
34. Thibault, O., R. Hadley, and P.W. Landfield, *Elevated postsynaptic [Ca²⁺]_i and L-type calcium channel activity in aged hippocampal neurons: relationship to impaired synaptic plasticity*. *J Neurosci*, 2001. **21**(24): p. 9744-56.

35. Wang, H., H. Xie, and S.K. Dey, *Endocannabinoid signaling directs periimplantation events*. *Aaps J*, 2006. **8**(2): p. E425-32.
36. Thie, M., et al., *Cell adhesion to the apical pole of epithelium: a function of cell polarity*. *Eur J Cell Biol*, 1995. **66**(2): p. 180-91.
37. Kemp, B., et al., *Invasive depth of extravillous trophoblast correlates with cellular phenotype: a comparison of intra- and extrauterine implantation sites*. *Histochem Cell Biol*, 2002. **117**(5): p. 401-14.
38. Tarachand, U., *Decidualisation: origin and role of associated cells*. *Biol Cell*, 1986. **57**(1): p. 9-16.
39. Enders, A.C. and A.O. Welsh, *Structural interactions of trophoblast and uterus during hemochorial placenta formation*. *J Exp Zool*, 1993. **266**(6): p. 578-87.
40. Stewart, C.L., et al., *Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor*. *Nature*, 1992. **359**(6390): p. 76-9.
41. Adamson, S.L., et al., *Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta*. *Dev Biol*, 2002. **250**(2): p. 358-73.
42. Malassine, A., J.L. Frendo, and D. Evain-Brion, *A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model*. *Hum Reprod Update*, 2003. **9**(6): p. 531-9.
43. Martalo, O., et al., *[A conjugally exacerbated allergy: procreation dermatosis]*. *Rev Med Liege*, 2002. **57**(5): p. 320-3.
44. Quevauviller, P., *Traceability of environmental chemical analyses: can theory match practice?* *Anal Bioanal Chem*, 2005. **382**(8): p. 1800-7.
45. Pitkin, R.M., *Endocrine regulation of calcium homeostasis during pregnancy*. *Clin Perinatol*, 1983. **10**(3): p. 575-92.
46. Kovacs, C.S. and H.M. Kronenberg, *Maternal-fetal calcium and bone metabolism during pregnancy, puerperium, and lactation*. *Endocr Rev*, 1997. **18**(6): p. 832-72.
47. Bellingham-Young, D.A. and E.N. Adamson-Macedo, *Foetal origins theory: links with adult depression and general self-efficacy*. *Neuro Endocrinol Lett*, 2003. **24**(6): p. 412-6.

48. Jones, J.H., *Fetal programming: adaptive life-history tactics or making the best of a bad start?* Am J Hum Biol, 2005. **17**(1): p. 22-33.
49. Ross, M.G. and M. Desai, *Gestational programming: population survival effects of drought and famine during pregnancy.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005. **288**(1): p. R25-33.
50. Guyton, D.P., D.M. Evans, and K.D. Sloan-Stakleff, *Urokinase Plasminogen Activator Receptor (uPAR): A Potential Indicator of Invasion for In Situ Breast Cancer.* Breast J, 2000. **6**(2): p. 130-136.
51. Gidenne, S., et al., *[Direct determination or estimated value of plasma ionized calcium : indications and limits].* Ann Biol Clin (Paris), 2003. **61**(4): p. 393-9.
52. Boink, A.B., et al., *International Federation of Clinical Chemistry (IFCC), scientific division: IFCC recommendation on sampling transport and storage for the determination of the concentration of ionized calcium in whole blood, plasma and serum.* Eur J Clin Chem Clin Biochem, 1991. **29**(11): p. 767-72.
53. Henriksen, T., et al., *[Intrauterine nutrition].* Tidsskr Nor Laegeforen, 1998. **118**(20): p. 3162-5.
54. Henriksen, T. and T. Clausen, *The fetal origins hypothesis: placental insufficiency and inheritance versus maternal malnutrition in well-nourished populations.* Acta Obstet Gynecol Scand, 2002. **81**(2): p. 112-4.
55. Delivoria-Papadopoulos, M., et al., *Total, protein-bound, and ultrafilterable calcium in maternal and fetal plasmas.* Am J Physiol, 1967. **213**(2): p. 363-6.
56. Kovacs, K., et al., *Comparative study of beta-tricalcium phosphate mixed with platelet-rich plasma versus beta-tricalcium phosphate, a bone substitute material in dentistry.* Acta Vet Hung, 2003. **51**(4): p. 475-84.
57. Kovacs, E.M., J. Rigo, Jr., and M. Toth, *[Two successful pregnancies after total thyroidectomy and parathyroidectomy].* Orv Hetil, 2003. **144**(30): p. 1493-5.
58. Kovacs, C.S. and C.L. Chik, *Hyperprolactinemia caused by lactation and pituitary adenomas is associated with altered serum calcium, phosphate, parathyroid*

- hormone (PTH), and PTH-related peptide levels. J Clin Endocrinol Metab, 1995. 80(10): p. 3036-42.*
59. Hosking, D.J., *Calcium homeostasis in pregnancy. Clin Endocrinol (Oxf), 1996. 45(1): p. 1-6.*
60. Brenza, H.L. and H.F. DeLuca, *Regulation of 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene expression by parathyroid hormone and 1,25-dihydroxyvitamin D3. Arch Biochem Biophys, 2000. 381(1): p. 143-52.*
61. Kong, X.F., et al., *Molecular cloning, characterization, and promoter analysis of the human 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase gene. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(12): p. 6988-93.*
62. Kovacs, C.S., et al., *The vitamin D receptor is not required for fetal mineral homeostasis or for the regulation of placental calcium transfer in mice. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. 289(1): p. E133-44.*
63. Cross, J.C., et al., *Genes, development and evolution of the placenta. Placenta, 2003. 24(2-3): p. 123-30.*
64. Prentice, A., *Maternal calcium metabolism and bone mineral status. Am J Clin Nutr, 2000. 71(5 Suppl): p. 1312S-6S.*
65. Gallacher, S.J., et al., *Changes in calciotropic hormones and biochemical markers of bone turnover in normal human pregnancy. Eur J Endocrinol, 1994. 131(4): p. 369-74.*
66. Wysolmerski, J.J. and A.E. Broadus, *Hypercalcemia of malignancy: the central role of parathyroid hormone-related protein. Annu Rev Med, 1994. 45: p. 189-200.*
67. Stewart, A.F., et al., *Biochemical evaluation of patients with cancer-associated hypercalcemia: evidence for humoral and nonhumoral groups. N Engl J Med, 1980. 303(24): p. 1377-83.*
68. Bounoutas, G.S., et al., *Impact of impaired receptor internalization on calcium homeostasis in knock-in mice expressing a phosphorylation-deficient parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor. Endocrinology, 2006. 147(10): p. 4674-9.*

69. Bond, H., et al., *Increased maternofetal calcium flux in parathyroid hormone-related protein-null mice*. J Physiol, 2008. **586**(7): p. 2015-25.
70. Abou-Samra, A.B., et al., *Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: a single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol trisphosphates and increases intracellular free calcium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(7): p. 2732-6.
71. Mangin, M., et al., *Identification of a cDNA encoding a parathyroid hormone-like peptide from a human tumor associated with humoral hypercalcemia of malignancy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(2): p. 597-601.
72. Lanske, B., et al., *PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth*. Science, 1996. **273**(5275): p. 663-6.
73. Balling, R. and R.G. Erben, *From parathyroid to thymus, via glial cells*. Nat Med, 2000. **6**(8): p. 860-1.
74. Mannstadt, M., H. Juppner, and T.J. Gardella, *Receptors for PTH and PTHrP: their biological importance and functional properties*. Am J Physiol, 1999. **277**(5 Pt 2): p. F665-75.
75. Gunther, T., et al., *Genetic ablation of parathyroid glands reveals another source of parathyroid hormone*. Nature, 2000. **406**(6792): p. 199-203.
76. Brown, E.M., *Physiology and pathophysiology of the extracellular calcium-sensing receptor*. Am J Med, 1999. **106**(2): p. 238-53.
77. Pearce, S.H. and E.M. Brown, *Disorders of calcium ion sensing*. J Clin Endocrinol Metab, 1996. **81**(6): p. 2030-5.
78. Tovar Sepulveda, V.A., X. Shen, and M. Falzon, *Intracrine PTHrP protects against serum starvation-induced apoptosis and regulates the cell cycle in MCF-7 breast cancer cells*. Endocrinology, 2002. **143**(2): p. 596-606.
79. van de Stolpe, A., et al., *Parathyroid hormone-related peptide as an endogenous inducer of parietal endoderm differentiation*. J Cell Biol, 1993. **120**(1): p. 235-43.

80. Plawner, L.L., et al., *Cell type-specific secretion of parathyroid hormone-related protein via the regulated versus the constitutive secretory pathway*. J Biol Chem, 1995. **270**(23): p. 14078-84.
81. Philbrick, W.M., et al., *Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology*. Physiol Rev, 1996. **76**(1): p. 127-73.
82. Martin, T.J., *Osteoblast-derived PTHrP is a physiological regulator of bone formation*. J Clin Invest, 2005. **115**(9): p. 2322-4.
83. Takasu, H., J. Guo, and F.R. Bringhurst, *Dual signaling and ligand selectivity of the human PTH/PTHrP receptor*. J Bone Miner Res, 1999. **14**(1): p. 11-20.
84. Karaplis, A.C., et al., *Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene*. Genes Dev, 1994. **8**(3): p. 277-89.
85. Clemens, T.L., et al., *Parathyroid hormone-related protein and its receptors: nuclear functions and roles in the renal and cardiovascular systems, the placental trophoblasts and the pancreatic islets*. Br J Pharmacol, 2001. **134**(6): p. 1113-36.
86. Yasuda, T., et al., *Characterization of the human parathyroid hormone-like peptide gene. Functional and evolutionary aspects*. J Biol Chem, 1989. **264**(13): p. 7720-5.
87. Vasavada, R.C., et al., *Identification and characterization of a GC-rich promoter of the human parathyroid hormone-related peptide gene*. Mol Endocrinol, 1993. **7**(2): p. 273-82.
88. Martin, T.J., J.M. Moseley, and E.D. Williams, *Parathyroid hormone-related protein: hormone and cytokine*. J Endocrinol, 1997. **154** Suppl: p. S23-37.
89. Chartrel, N., J. Costentin, and H. Vaudry, *[The frog who wished to be as big as an ox: characterization in amphibians of a novel neuropeptide that stimulates appetite in mammals]*. Med Sci (Paris), 2004. **20**(10): p. 839-42.
90. Seitz, P.K., et al., *Effects of C-terminal parathyroid hormone-related peptide on osteoblasts*. Miner Electrolyte Metab, 1995. **21**(1-3): p. 180-3.
91. Whitfield, J.F., et al., *C-terminal fragment of parathyroid hormone-related protein, PTHrP-(107-111), stimulates membrane-associated protein kinase C activity and*

- modulates the proliferation of human and murine skin keratinocytes.* J Cell Physiol, 1996. **166**(1): p. 1-11.
92. Goomer, R.S., et al., *The tetrabasic KKKK(147-150) motif determines intracrine regulatory effects of PthrP 1-173 on chondrocyte PPI metabolism and matrix synthesis.* Endocrinology, 2000. **141**(12): p. 4613-22.
 93. Gardella, T.J. and H. Juppner, *Molecular properties of the PTH/PTHrP receptor.* Trends Endocrinol Metab, 2001. **12**(5): p. 210-7.
 94. Grill, V., W. Rankin, and T.J. Martin, *Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) and hypercalcaemia.* Eur J Cancer, 1998. **34**(2): p. 222-9.
 95. Watson, P.H., et al., *Nuclear localization of the type 1 PTH/PTHrP receptor in rat tissues.* J Bone Miner Res, 2000. **15**(6): p. 1033-44.
 96. Usdin, T.B., C. Gruber, and T.I. Bonner, *Identification and functional expression of a receptor selectively recognizing parathyroid hormone, the PTH2 receptor.* J Biol Chem, 1995. **270**(26): p. 15455-8.
 97. Rubin, D.A. and H. Juppner, *Zebrafish express the common parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor (PTH1R) and a novel receptor (PTH3R) that is preferentially activated by mammalian and fugu fish parathyroid hormone-related peptide.* J Biol Chem, 1999. **274**(40): p. 28185-90.
 98. Schipani, E. and S. Provot, *PTHrP, PTH, and the PTH/PTHrP receptor in endochondral bone development.* Birth Defects Res C Embryo Today, 2003. **69**(4): p. 352-62.
 99. Rey, A., et al., *Proline-rich motifs in the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein receptor C terminus mediate scaffolding of c-Src with beta-arrestin2 for ERK1/2 activation.* J Biol Chem, 2006. **281**(50): p. 38181-8.
 100. Silve, C., *[FGF23, a "new" hormone regulating phosphate homeostasis and vitamin D metabolism].* Presse Med, 2005. **34**(19 Pt 1): p. 1384-90.
 101. Blomstrand, S., I. Claesson, and J. Save-Soderbergh, *A case of lethal congenital dwarfism with accelerated skeletal maturation.* Pediatr Radiol, 1985. **15**(2): p. 141-3.
 102. Carafoli, E., *The calcium pumping ATPase of the plasma membrane.* Annu Rev Physiol, 1991. **53**: p. 531-47.

103. Stauffer, T.P., D. Guerini, and E. Carafoli, *Tissue distribution of the four gene products of the plasma membrane Ca²⁺ pump. A study using specific antibodies.* J Biol Chem, 1995. **270**(20): p. 12184-90.
104. Strehler, E.E. and D.A. Zacharias, *Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps.* Physiol Rev, 2001. **81**(1): p. 21-50.
105. Lew, V.L., et al., *Physiological [Ca²⁺]_i level and pump-leak turnover in intact red cells measured using an incorporated Ca chelator.* Nature, 1982. **298**(5873): p. 478-81.
106. Landry, D.W., et al., *Hypocellularity and absence of compaction as criteria for embryonic death.* Regen Med, 2006. **1**(3): p. 367-71.
107. Di Leva, F., et al., *The plasma membrane Ca(2+) ATPase of animal cells: Structure, function and regulation.* Arch Biochem Biophys, 2008.
108. Sippel, H., I. Stauffert, and C.J. Estler, *Protective effect of various calcium antagonists against an experimentally induced calcium overload in isolated hepatocytes.* Biochem Pharmacol, 1993. **46**(11): p. 1937-44.
109. Carafoli, E., *The signaling function of calcium and its regulation.* J Hypertens Suppl, 1994. **12**(10): p. S47-56.
110. Penniston, J.T. and A. Enyedi, *Modulation of the plasma membrane Ca²⁺ pump.* J Membr Biol, 1998. **165**(2): p. 101-9.
111. Goldberg, J., A.C. Nairn, and J. Kuriyan, *Structural basis for the autoinhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase I.* Cell, 1996. **84**(6): p. 875-87.
112. Campbell, I.L., et al., *Structural and functional neuropathology in transgenic mice with CNS expression of IFN- α .* Brain Res, 1999. **835**(1): p. 46-61.
113. James, P., et al., *Identification and primary structure of a calmodulin binding domain of the Ca²⁺ pump of human erythrocytes.* J Biol Chem, 1988. **263**(6): p. 2905-10.
114. Enyedi, A., et al., *The calmodulin binding domain of the plasma membrane Ca²⁺ pump interacts both with calmodulin and with another part of the pump.* J Biol Chem, 1989. **264**(21): p. 12313-21.

115. Falchetto, R., et al., *The plasma membrane Ca²⁺ pump contains a site that interacts with its calmodulin-binding domain*. J Biol Chem, 1991. **266**(5): p. 2930-6.
116. Falchetto, R., T. Vorherr, and E. Carafoli, *The calmodulin-binding site of the plasma membrane Ca²⁺ pump interacts with the transduction domain of the enzyme*. Protein Sci, 1992. **1**(12): p. 1613-21.
117. Kosk-Kosicka, D. and T. Bzdega, *Activation of the erythrocyte Ca²⁺-ATPase by either self-association or interaction with calmodulin*. J Biol Chem, 1988. **263**(34): p. 18184-9.
118. Brodin, P., et al., *Identification of two domains which mediate the binding of activating phospholipids to the plasma-membrane Ca²⁺ pump*. Eur J Biochem, 1992. **204**(2): p. 939-46.
119. Filoteo, A.G., A. Enyedi, and J.T. Penniston, *The lipid-binding peptide from the plasma membrane Ca²⁺ pump binds calmodulin, and the primary calmodulin-binding domain interacts with lipid*. J Biol Chem, 1992. **267**(17): p. 11800-5.
120. Kamath, S.G., N. Haider, and C.H. Smith, *ATP independent calcium transport and binding by basal plasma membrane of human placenta*. Placenta, 1994. **15**(2): p. 147-55.
121. Strid, H. and T.L. Powell, *ATP-dependent Ca²⁺ transport is up-regulated during third trimester in human syncytiotrophoblast basal membranes*. Pediatr Res, 2000. **48**(1): p. 58-63.
122. Howard, A., S. Legon, and J.R. Walters, *Plasma membrane calcium pump expression in human placenta and small intestine*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. **183**(2): p. 499-505.
123. Zylinska, L., et al., *The isoform- and location-dependence of the functioning of the plasma membrane calcium pump*. Cell Mol Biol Lett, 2002. **7**(4): p. 1037-45.
124. Salle, B.L., et al., *Vitamin D metabolism in preterm infants*. Biol Neonate, 1987. **52 Suppl 1**: p. 119-30.

125. Kozel, P.J., et al., *Balance and hearing deficits in mice with a null mutation in the gene encoding plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoform 2*. J Biol Chem, 1998. **273**(30): p. 18693-6.
126. Okunade, G.W., et al., *Targeted ablation of plasma membrane Ca²⁺-ATPase (PMCA) 1 and 4 indicates a major housekeeping function for PMCA1 and a critical role in hyperactivated sperm motility and male fertility for PMCA4*. J Biol Chem, 2004. **279**(32): p. 33742-50.
127. Penheiter, A.R., et al., *Characterization of the deafwaddler mutant of the rat plasma membrane calcium-ATPase 2*. Hear Res, 2001. **162**(1-2): p. 19-28.
128. Strid, H., et al., *Parathyroid hormone-related peptide (38-94) amide stimulates ATP-dependent calcium transport in the Basal plasma membrane of the human syncytiotrophoblast*. J Endocrinol, 2002. **175**(2): p. 517-24.
129. Montell, C., et al., *A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels*. Mol Cell, 2002. **9**(2): p. 229-31.
130. Hoenderop, J.G., et al., *Function and expression of the epithelial Ca(2+) channel family: comparison of mammalian ECaC1 and 2*. J Physiol, 2001. **537**(Pt 3): p. 747-61.
131. Qiu, A. and C. Hogstrand, *Functional characterisation and genomic analysis of an epithelial calcium channel (ECaC) from pufferfish, Fugu rubripes*. Gene, 2004. **342**(1): p. 113-23.
132. Hoenderop, J.G., et al., *Renal Ca²⁺ wasting, hyperabsorption, and reduced bone thickness in mice lacking TRPV5*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1906-14.
133. Chang, Q., et al., *Molecular determinants in TRPV5 channel assembly*. J Biol Chem, 2004. **279**(52): p. 54304-11.
134. Hoenderop, J.G., et al., *Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6*. Embo J, 2003. **22**(4): p. 776-85.
135. Gunthorpe, M.J., et al., *The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels*. Trends Pharmacol Sci, 2002. **23**(4): p. 183-91.

136. Nilius, B., et al., *The single pore residue Asp542 determines Ca²⁺ permeation and Mg²⁺ block of the epithelial Ca²⁺ channel*. J Biol Chem, 2001. **276**(2): p. 1020-5.
137. Schoeber, J.P., J.G. Hoenderop, and R.J. Bindels, *Concerted action of associated proteins in the regulation of TRPV5 and TRPV6*. Biochem Soc Trans, 2007. **35**(Pt 1): p. 115-9.
138. Peng, J.B., E.M. Brown, and M.A. Hediger, *Epithelial Ca²⁺ entry channels: transcellular Ca²⁺ transport and beyond*. J Physiol, 2003. **551**(Pt 3): p. 729-40.
139. Nijenhuis, T., J.G. Hoenderop, and R.J. Bindels, *TRPV5 and TRPV6 in Ca(2+) (re)absorption: regulating Ca(2+) entry at the gate*. Pflugers Arch, 2005. **451**(1): p. 181-92.
140. Hoenderop, J.G., B. Nilius, and R.J. Bindels, *Calcium absorption across epithelia*. Physiol Rev, 2005. **85**(1): p. 373-422.
141. van Abel, M., J.G. Hoenderop, and R.J. Bindels, *The epithelial calcium channels TRPV5 and TRPV6: regulation and implications for disease*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2005. **371**(4): p. 295-306.
142. Niemeyer, B.A., et al., *Competitive regulation of CaT-like-mediated Ca²⁺ entry by protein kinase C and calmodulin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(6): p. 3600-5.
143. Hoenderop, J.G., et al., *Molecular identification of the apical Ca²⁺ channel in 1, 25-dihydroxyvitamin D₃-responsive epithelia*. J Biol Chem, 1999. **274**(13): p. 8375-8.
144. Peng, J.B., et al., *Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption*. J Biol Chem, 1999. **274**(32): p. 22739-46.
145. Fleet, J.C., et al., *Vitamin D-inducible calcium transport and gene expression in three Caco-2 cell lines*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002. **283**(3): p. G618-25.
146. Moreau, R., et al., *Calcium uptake and calcium transporter expression by trophoblast cells from human term placenta*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1564**(2): p. 325-32.
147. Hoenderop, J.G., et al., *Localization of the epithelial Ca(2+) channel in rabbit kidney and intestine*. J Am Soc Nephrol, 2000. **11**(7): p. 1171-8.

148. Peng, J.B., et al., *Human calcium transport protein CaT1*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **278**(2): p. 326-32.
149. Berggard, T., et al., *Fragment complementation of calbindin D28k*. *Protein Sci*, 2000. **9**(11): p. 2094-108.
150. Lambers, T.T., et al., *Calbindin-D28K dynamically controls TRPV5-mediated Ca²⁺ transport*. *Embo J*, 2006. **25**(13): p. 2978-88.
151. Arnold, B.M., et al., *Radioimmunoassay studies of intestinal calcium-binding protein in the pig. I. Identification of intestinal calcium-binding protein in blood and response to a low calcium diet*. *Can J Physiol Pharmacol*, 1975. **53**(6): p. 1129-34.
152. Moncrief, N.D., R.H. Kretsinger, and M. Goodman, *Evolution of EF-hand calcium-modulated proteins. I. Relationships based on amino acid sequences*. *J Mol Evol*, 1990. **30**(6): p. 522-62.
153. Cao, L.P., et al., *Regulation of calbindin-D9k expression by 1,25-dihydroxyvitamin D(3) and parathyroid hormone in mouse primary renal tubular cells*. *Arch Biochem Biophys*, 2002. **400**(1): p. 118-24.
154. Jeung, E.B., P.C. Leung, and J. Krisinger, *The human calbindin-D9k gene. Complete structure and implications on steroid hormone regulation*. *J Mol Biol*, 1994. **235**(4): p. 1231-8.
155. Hershberger, M.E. and R.S. Tuan, *Placental 57-kDa Ca(2+)-binding protein: regulation of expression and function in trophoblast calcium transport*. *Dev Biol*, 1998. **199**(1): p. 80-92.
156. Tymianski, M., *Cytosolic calcium concentrations and cell death in vitro*. *Adv Neurol*, 1996. **71**: p. 85-105.
157. Schwaller, B., M. Meyer, and S. Schiffmann, *'New' functions for 'old' proteins: the role of the calcium-binding proteins calbindin D-28k, calretinin and parvalbumin, in cerebellar physiology. Studies with knockout mice*. *Cerebellum*, 2002. **1**(4): p. 241-58.
158. Bronner, F., *Vitamin D-dependent active calcium transport: the role of CaBP*. *Calcif Tissue Int*, 1988. **43**(3): p. 133-7.

159. Emberley, E.D., L.C. Murphy, and P.H. Watson, *S100 proteins and their influence on pro-survival pathways in cancer*. *Biochem Cell Biol*, 2004. **82**(4): p. 508-15.
160. Rothermundt, M., G. Ponath, and V. Arolt, *S100B in schizophrenic psychosis*. *Int Rev Neurobiol*, 2004. **59**: p. 445-70.
161. Heizmann, C.W., *Ca²⁺-binding S100 proteins in the central nervous system*. *Neurochem Res*, 1999. **24**(9): p. 1097-100.
162. Choi, K.C., P.C. Leung, and E.B. Jeung, *Biology and physiology of Calbindin-D9k in female reproductive tissues: involvement of steroids and endocrine disruptors*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2005. **3**: p. 66.
163. Marenholz, I., C.W. Heizmann, and G. Fritz, *S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature)*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **322**(4): p. 1111-22.
164. Jeung, E.B., et al., *Molecular cloning of the full-length cDNA encoding the human calbindin-D9k*. *FEBS Lett*, 1992. **307**(2): p. 224-8.
165. Kawasaki, H., S. Nakayama, and R.H. Kretsinger, *Classification and evolution of EF-hand proteins*. *Biometals*, 1998. **11**(4): p. 277-95.
166. Carafoli, E., *Calcium signaling: a tale for all seasons*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(3): p. 1115-22.
167. Muller, D., et al., *Molecular cloning, tissue distribution, and chromosomal mapping of the human epithelial Ca²⁺ channel (ECAC1)*. *Genomics*, 2000. **67**(1): p. 48-53.
168. Cai, X. and J. Lytton, *Molecular cloning of a sixth member of the K⁺-dependent Na⁺/Ca²⁺ exchanger gene family, NCKX6*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(7): p. 5867-76.
169. Nicoll, D.A., S. Longoni, and K.D. Philipson, *Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na⁺-Ca²⁺ exchanger*. *Science*, 1990. **250**(4980): p. 562-5.
170. Li, Z., et al., *Cloning of the NCX2 isoform of the plasma membrane Na⁺-Ca²⁺ exchanger*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(26): p. 17434-9.
171. Nicoll, D.A., et al., *Cloning of a third mammalian Na⁺-Ca²⁺ exchanger, NCX3*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(40): p. 24914-21.

172. Blaustein, M.P. and W.J. Lederer, *Sodium/calcium exchange: its physiological implications*. *Physiol Rev*, 1999. **79**(3): p. 763-854.
173. Lytton, J., *Na⁺/Ca²⁺ exchangers: three mammalian gene families control Ca²⁺ transport*. *Biochem J*, 2007. **406**(3): p. 365-82.
174. Matsuoka, S., et al., *Initial localization of regulatory regions of the cardiac sarcolemmal Na⁺-Ca²⁺ exchanger*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(9): p. 3870-4.
175. Schwarz, E.M. and S. Benzer, *Calx, a Na-Ca exchanger gene of Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(19): p. 10249-54.
176. Quednau, B.D., D.A. Nicoll, and K.D. Philipson, *Tissue specificity and alternative splicing of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger isoforms NCX1, NCX2, and NCX3 in rat*. *Am J Physiol*, 1997. **272**(4 Pt 1): p. C1250-61.
177. Nakasaki, Y., et al., *Cloning of the rat aortic smooth muscle Na⁺/Ca²⁺ exchanger and tissue-specific expression of isoforms*. *J Biochem*, 1993. **114**(4): p. 528-34.
178. Schulze, D.H., et al., *Alternative splicing of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger gene, NCX1*. *Ann N Y Acad Sci*, 1996. **779**: p. 46-57.
179. Nicoll, D.A., et al., *The crystal structure of the primary Ca²⁺ sensor of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger reveals a novel Ca²⁺ binding motif*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(31): p. 21577-81.
180. Linck, B., et al., *Functional comparison of the three isoforms of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX1, NCX2, NCX3)*. *Am J Physiol*, 1998. **274**(2 Pt 1): p. C415-23.
181. Azarani, A., J. Orłowski, and D. Goltzman, *Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide activate the Na⁺/H⁺ exchanger NHE-1 isoform in osteoblastic cells (UMR-106) via a cAMP-dependent pathway*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(39): p. 23166-72.
182. Reuter, H. and K.D. Philipson, *Sodium-calcium exchanger overexpression in the heart--insights from a transgenic mouse model*. *Basic Res Cardiol*, 2002. **97 Suppl 1**: p. I31-5.

183. Wakimoto, K., et al., *Targeted disruption of Na⁺/Ca²⁺ exchanger gene leads to cardiomyocyte apoptosis and defects in heartbeat*. J Biol Chem, 2000. **275**(47): p. 36991-8.
184. Williams, J.M., et al., *Inhibitor action on placental calcium transport*. Calcif Tissue Int, 1991. **48**(1): p. 7-12.
185. Moreau, R., et al., *Expression and role of calcium-ATPase pump and sodium-calcium exchanger in differentiated trophoblasts from human term placenta*. Mol Reprod Dev, 2003. **65**(3): p. 283-8.
186. Gachet, Y., et al., *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, 1999. **112 (Pt 8)**: p. 1257-71.
187. Bommer, U.A. and B.J. Thiele, *The translationally controlled tumour protein (TCTP)*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(3): p. 379-85.
188. MacDonald, S.M., et al., *Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor*. Science, 1995. **269**(5224): p. 688-90.
189. Li, F., D. Zhang, and K. Fujise, *Characterization of fortilin, a novel antiapoptotic protein*. J Biol Chem, 2001. **276**(50): p. 47542-9.
190. Xu, A., A.R. Bellamy, and J.A. Taylor, *Expression of translationally controlled tumour protein is regulated by calcium at both the transcriptional and post-transcriptional level*. Biochem J, 1999. **342 Pt 3**: p. 683-9.
191. Kim, M., et al., *Identification of the calcium binding sites in translationally controlled tumor protein*. Arch Pharm Res, 2000. **23**(6): p. 633-6.
192. Thiele, H., et al., *Structure of the promoter and complete sequence of the gene coding for the rabbit translationally controlled tumor protein (TCTP) P23*. Eur J Biochem, 1998. **257**(1): p. 62-8.
193. Bommer, U.A., et al., *The mRNA of the translationally controlled tumor protein P23/TCTP is a highly structured RNA, which activates the dsRNA-dependent protein kinase PKR*. Rna, 2002. **8**(4): p. 478-96.

194. Bonnet, C., et al., *Identification and transcription control of fission yeast genes repressed by an ammonium starvation growth arrest*. *Yeast*, 2000. **16**(1): p. 23-33.
195. Fleischman, A.R., et al., *Maternal and fetal serum 1,25-dihydroxyvitamin D levels at term*. *J Pediatr*, 1980. **97**(4): p. 640-2.
196. Hollis, B.W. and W.B. Pittard, 3rd, *Evaluation of the total fetomaternal vitamin D relationships at term: evidence for racial differences*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1984. **59**(4): p. 652-7.
197. Kovacs, C.S., et al., *Regulation of murine fetal-placental calcium metabolism by the calcium-sensing receptor*. *J Clin Invest*, 1998. **101**(12): p. 2812-20.
198. Seki, K., et al., *Cord blood levels of calcium-regulating hormones and osteocalcin in premature infants*. *J Perinat Med*, 1994. **22**(3): p. 189-94.
199. Wieland, P., et al., *Perinatal parathyroid hormone, vitamin D metabolites, and calcitonin in man*. *Am J Physiol*, 1980. **239**(5): p. E385-90.
200. Johnson, J.A., et al., *Immunohistochemical detection and distribution of the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in rat reproductive tissues*. *Histochem Cell Biol*, 1996. **105**(1): p. 7-15.
201. Cross, R.J., et al., *Functional characterization of the insulin-like growth factor I receptor on Jurkat T cells*. *Cell Immunol*, 1995. **160**(2): p. 205-10.
202. Wysolmerski, J.J. and A.F. Stewart, *The physiology of parathyroid hormone-related protein: an emerging role as a developmental factor*. *Annu Rev Physiol*, 1998. **60**: p. 431-60.
203. Care, A.D., et al., *The effect of fetal thyroparathyroidectomy on the transport of calcium across the ovine placenta to the fetus*. *Placenta*, 1986. **7**(5): p. 417-24.
204. Abbas, S.K., et al., *Stimulation of ovine placental calcium transport by purified natural and recombinant parathyroid hormone-related protein (PTHrP) preparations*. *Q J Exp Physiol*, 1989. **74**(4): p. 549-52.