

Université de Montréal

Effet stimulateur du neuropeptide Y sur la sécrétion du facteur de relâche de la corticostimuline (CRF) par les cellules trophoblastiques du placenta humain

par

Jacques Robidoux

Programme de Sciences Biomédicales

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
En vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en sciences biomédicales



décembre, 1999

© Jacques Robidoux, 1999

W
4
U58
2000
v. 035

L'université de Montréal

États-Unis d'Amérique - Université Y sur la réaction du fémur de raté de la
cartilage (CRF) en les cellules trophoblastiques de placenta humain

par

Jacques Robitaille

Programme de Sciences Biomédicales

Faculté de médecine

Tous présentés à la Faculté des études supérieures
En vue de l'obtention du grade de
Philosophie (Doctorat Ph.D.)
en sciences biomédicales



depuis le 1990

Jacques Robitaille, 1990

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Effet stimulateur du neuropeptide Y sur la sécrétion du facteur de relâche de la
corticotestimuline (CRF) par les cellules trophoblastiques du placenta humain

Présentée par

Jacques Robidoux

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

.....	président du jury
Daniel Lajeunesse, Ph.D.	
.....	directrice de recherche
Julie Lafond, Ph.D.	
.....	examinatrice externe
Alice Hontela, Ph.D.	
.....	examineur externe
Pédro D'Orléans-Juste, Ph.D.	
.....	représentant(e) du doyen
Serge Bélisle, M.D.	

SOMMAIRE

L'accouchement, l'aboutissement ultime de la grossesse, est un processus bien orchestré mettant en œuvre une pléiade de peptides produits par le placenta. Récemment, la mise en évidence d'une relation entre la durée de la grossesse et la concentration plasmatique du facteur de relâche de la corticostimuline (CRF) a permis de proposer un lien entre ce peptide et l'horloge placentaire déterminant la durée de la grossesse. Or, le neuropeptide Y (NPY), un peptide produit abondamment par le placenta tout au long de la grossesse, stimule *in vitro* la relâche du CRF par le syncytiotrophoblaste. Puisque ce syncytiotrophoblaste est connu pour être, du moins durant le troisième trimestre de la grossesse, la principale origine du CRF circulant, le but de cette thèse est d'étudier les modalités de cet effet du NPY.

Les hypothèses principales ayant balisé cette étude ont été: 1) le syncytiotrophoblaste arbore des récepteurs pour le NPY ; 2) un mode de relâche du CRF dépendant du calcium est présent dans le syncytiotrophoblaste et 3) la stimulation de la relâche du CRF par le NPY dans les cellules trophoblastiques implique des voies de signalisation en amont et en aval d'une hausse de la concentration du calcium intracellulaire.

En premier lieu, étant donné la nature polaire du syncytiotrophoblaste, les études de liaison ont été effectuées en parallèle sur des membranes d'origine apicale (BBM) et basale (BPM) afin de déterminer s'il y a une ségrégation des sites de liaisons pour le NPY. Les résultats obtenus suggèrent l'existence d'une population mixte de sites de liaison du NPY (Y_1 et Y_3) se retrouvant exclusivement sur les BBM.

Par la suite, les voies de signalisation associées aux récepteurs du NPY ont été explorées sur des préparations de BBM ou sur des cellules trophoblastiques en culture primaire.

Les résultats obtenus montrent que dans les BBM, l'interaction du NPY avec le récepteur de sous-type Y_1 est couplée à l'activation des phospholipases C- β (PLC- β), ces dernières étant responsables, en partie, d'une activation des protéines kinases C (PKCs). L'autre portion de l'activation de ces PKCs étant attribuable à l'activation des kinases de la position D3 des phosphoinositides (PI3-K). Les résultats obtenus à l'aide des cellules trophoblastiques montrent que le NPY entraîne l'activation de la kinase dépendante du calcium et de la calmoduline de type II (CaMKII) et des MAP kinases de type ERK_{1/2} (ERK_{1/2}).

En troisième lieu, afin de vérifier lesquelles de ces voies de signalisation sont impliquées dans le contrôle de la relâche du CRF par le NPY, nous avons, dans un premier temps, caractérisé l'habileté des cellules trophoblastiques à sécréter le CRF. Cette étape importante montre que les cytotrophoblastes issus de placentas à terme, acquièrent, en parallèle avec leur différenciation vers le phénotype apparenté au syncytiotrophoblaste, l'habileté de sécréter le CRF.

En dernier lieu, nous avons démontré que le NPY, en interagissant avec des récepteurs de type Y_1 , induit la synthèse et la relâche du CRF par les cellules trophoblastiques. L'augmentation de la synthèse est, en grande partie, attribuable à l'activation des PLC- β , la relâche subséquente du calcium des réserves intracellulaires et à l'activation de la CaMKII. L'augmentation de la relâche est subséquente à l'activation de PKCs indépendantes du calcium, à l'activation de l'axe initié par les PLC- β et à un influx calcique ne passant pas par les L-VOCC. Intéressamment, l'activation directe des L-VOCC avec le Bay K8644, bien qu'entraînant l'activation des CaMKII, favorise la relâche du CRF sans influencer la synthèse du peptide.

Pris dans leur globalité, ces résultats illustrent bien la pluralité de la signalisation des récepteurs de sous-type Y_1 et la complexité du contrôle de la relâche du CRF par le NPY. De plus, ces résultats sont une étape importante dans la compréhension des mécanismes qui permettent aux peptides interagissant avec un récepteur couplé aux

protéines liant les nucléotides guanyliques (protéines G), sensibles à la toxine pertussique (PTX), de réguler la relâche du CRF.

TABLE DES MATIÈRE

IDENTIFICATION DU JURY.....	ii
SOMMAIRE.....	iii
TABLE DES MATIÈRE.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xiii
REMERCIEMENTS ET DÉDICACE.....	xvi
CHAPITRE PREMIER : INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE SECOND : REVUE DE LITTÉRATURE.....	4
1. Formation de l'unité placentaire et de ses structures fonctionnelles.....	4
1.1. Formation du placenta humain et des membranes annexes.....	4
1.2. La structure des villosités chorioniques du placenta mature.....	7
1.2.1. Les villosités.....	7
1.2.2. La villosité terminale et le syncytiotrophoblaste.....	9
1.3. Formation de la circulation placentaire.....	13
1.4. Les modifications de la circulation maternelle.....	14
2. L'unité placentaire en tant qu'organe endocrinien.....	14
2.1. Le neuropeptide Y.....	15
2.1.1. Distribution du NPY, du PYY et du PP.....	16
2.1.2. Origine de la hausse de la concentration plasmatique du NPY durant la grossesse.....	18
2.1.3. Rôles du NPY dans le système reproducteur féminin.....	18
2.1.4. Métabolisme du NPY.....	20
2.1.5. Les récepteurs du NPY.....	21
2.1.5.1. Les récepteurs clonés.....	22

2.1.5.1.1. Le sous-type Y1.....	22
2.1.5.1.2. Le sous-type Y2.....	25
2.1.5.1.3. Le sous-type Y4.....	27
2.1.5.1.4. Le sous-type Y5.....	28
2.1.5.1.5. Le sous-type y6.....	29
2.1.5.1.6. Le sous-type zYa.....	30
2.1.5.2. Les récepteurs non-clonés.....	30
2.1.5.2.1. Le sous-type Y3.....	30
2.1.5.2.2. Le sous-type <i>PYY-preferring</i>	31
2.1.6. Signalisation des récepteurs liés aux protéine G hétérotrimériques sensibles à la toxine <i>de Bordetella pertussis</i>	32
2.1.6.1. Structure des récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques.....	33
2.1.6.2. Structure et rôle des protéines G hétérotrimériques.....	34
2.1.6.3. Modèle d'activation des récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques.....	36
2.1.6.3.1. Le complexe ternaire.....	36
2.1.6.3.2. Le complexe ternaire allostérique.....	36
2.1.6.3.3. L'aiguillage ou la promiscuité contrôlée.....	37
2.1.6.3.4. Le modèle d'interaction séquentielle.....	38
2.1.6.3.5. Intégration des différents modèles.....	39
2.1.6.4. Les effecteurs dont l'activité est modulée par les récepteurs couplés aux protéines G sensibles à la toxine pertussique.....	40
2.1.6.4.1. Voies d'activation des protéines kinases C par les récepteurs couplés aux protéines G sensibles à la toxine pertussique et rôles de ces kinases dans la sécrétion hormonale.....	40
2.1.6.4.2. Voies d'activation des MAP kinases de type ERK1/2 par les récepteurs couplés aux protéines G sensibles à la toxine pertussique et rôles de ces kinases dans la sécrétion hormonale.....	49
2.1.6.4.3. L'activation des kinases dépendantes du complexe calcium-calmoduline de type II par les récepteurs couplés aux protéines G sensibles à la toxine pertussique et rôles de ces kinases dans la sécrétion hormonale.....	53

2.2. Le facteur de relâche de la corticostimuline.....	62
2.2.1. Distribution et rôles principaux du CRF.....	63
2.2.2. Origine de la hausse de la concentration plasmatique de CRF durant la grossesse.....	64
2.2.3. Régulation de l'expression et de la relâche du CRF.....	66
2.2.4. Rôles du CRF durant la grossesse.....	69
2.2.4.1. Rôles progestatifs du CRF.....	69
2.2.4.2. Influence du CRF sur l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien.....	69
2.2.4.2.1. L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien maternel.....	70
2.2.4.2.2. L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien fœtal.....	70
2.2.4.3. Implication du CRF sur la maturation fœtale et l'initiation du travail.....	72
2.2.4.3.1. Le myomètre utérin quiescent.....	72
2.2.4.3.2. L'initiation du travail et de l'accouchement.....	73
2.2.4.3.3. Le CRF dans l'initiation du travail et de l'accouchement.....	76
2.3. La gonadotropine chorionique.....	78
2.3.1. Origine et régulation de la relâche de la gonadotropine chorionique.....	78
2.3.2. Rôles physiologiques de la hCG.....	80
CHAPITRE TROISIÈME : Human syncytiotrophoblast NPY receptors are located on BBM and activate PLC-to-PKC axis. (Am J Physiol. 274: E502-E509).....	81
CHAPITRE QUATRIÈME: Activation of L-type calcium channels induces corticotropin releasing factor secretion from human placental trophoblasts. (J Clin Endocrinol Metab. accepté).....	118
CHAPITRE CINQUIÈME: Characterization of neuropeptide Y mediated corticotropin releasing factor synthesis and release from human placental trophoblasts (Endocrinology. Aout 2000).....	155
CHAPITRE SIXIÈME: DISCUSSION.....	195
BIBLIOGRAPHIE.....	209

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Ordre relatif de la puissance des différents agonistes envers envers les différents sous-types de récepteurs du NPY.....	24
Tableau II (tableau I du premier article). NPY and related peptides affinities for ¹²⁵ I-NPY binding sites in BBM of syncytiotrophoblast from human term placenta.....	118

LISTE DES FIGURES

- Figure 1. L'unité utéro-placentaire humaine est composée de l'amnios, du chorion, des villosités chorioniques, de la caduque et du myomètre utérin..... 5
- Figure 2. Schéma d'une coupe transversale d'une villosité terminale..... 11
- Figure 3. Modèle d'Onaran et Costa (1997), appliqué à un récepteur ayant trois conformations actives (I, II et III)..... 39
- Figure 4. Représentation schématique de l'activation des PKCs..... 44
- Figure 5. Représentation schématique de l'activation des ERK1/2..... 52
- Figure 6. Représentation schématique de l'activation des CaMKII..... 59
- Figure 7. (figure 1 du premier article). Saturation curves of ^{125}I -labeled neuropeptide Y (^{125}I -NPY) binding to brush-border (BBM; A) and basal plasma (BPM; B) membranes of syncytiotrophoblast from human term placenta at 37°C for 20 min..... 109
- Figure 8. (figure 2 du premier article). Ligand competition curves for ^{125}I -NPY binding to BBM of syncytiotrophoblast from human term placenta..... 110
- Figure 9. (figure 3 du premier article). D-myo-inositol 1,4,5-triphosphate [Ins(1,4,5)P₃] production in BBM of syncytiotrophoblast in presence of increasing concentration of NPY or PYY..... 111
- Figure 10. (figure 4 du premier article). Effects of U-73122 on the Ins(1,4,5)P₃ production stimulated by NPY or PYY in BBM of syncytiotrophoblast..... 112
- Figure 11. (figure 5 du premier article). Ins(1,4,5)P₃ production in BBM of syncytiotrophoblast in presence of increasing concentration of NPY or PYY after 5-min preincubation with 5 μM BIBP-3226 or solvent..... 113
- Figure 12. (figure 6 du premier article). Protein kinase C (PKC) activation in BBM of syncytiotrophoblast in presence of increasing concentration of NPY or PYY.. 114

Figure 13. (figure 7 du premier article). PKC activation in BBM of syncytiotrophoblast in presence of increasing concentration of NPY or PYY after 5-min preincubation with 5 μ M BIBP-3226 or solvent.....	115
Figure 14. (figure 8 du premier article). Effects of U-73122 or calphostin C on PKC activity in BBM of syncytiotrophoblast incubated at 37°C for 1 min in presence of 100 nM of NPY or PYY.....	116
Figure 15. (figure 9 du premier article). Effects of U-73122 (U), LY294002 (LY), or both on PKC activity in BBM of syncytiotrophoblast incubated at 37°C for 1 min in presence of 100 nM of NPY or PYY.....	117
Figure 16. (figure 1 du deuxième article). Time course of basal CRF and hCG secretion by human placental trophoblasts in culture over a 7 days period.....	149
Figure 17. (figure 2 du deuxième article). Time course of basal CRF secretion by cultured syncytiotrophoblasts over a 24 h period.....	150
Figure 18. (figure 3 du deuxième article). Effect of BAPTA/AM and nitrendipine on KCl-induced CRF release.....	151
Figure 19. (figure 4 du deuxième article). Effect of BAPTA/AM and nitrendipine on Bay K8644-induced CRF release.....	152
Figure 20. (figure 5 du deuxième article). Time-course of CaMKII activation by Bay K8644.....	153
Figure 21. (figure 6 du deuxième article). Time-course of ERK _{1/2} activation by Bay K8644.....	154
Figure 22. (figure 7 du deuxième article). Effect of Gö6976, AIP and PD 098056 on Bay K8644-induced CRF release.....	155
Figure 23. (figure 1 du troisième article). Effects of NPY on total CRF content and CRF release from human placental trophoblasts.....	188
Figure 24. (figure 2 du troisième article). Effect of BIBP3226 (Y ₁ antagonist) and PTX on NPY-induced CRF synthesis and release.....	189
Figure 25. (figure 3 du troisième article). Effect of BAPTA/AM and nitrendipine on NPY-induced CRF synthesis and release.....	190
Figure 26. (figure 4 du troisième article). Effect of U-73122, xestospongine C and SKF 96365 on NPY-induced CRF synthesis and release.....	191

Figure 27. (figure 5 du troisième article). Time-course of CaMKII activation by NPY. Cells were serum starved 1 h.....	192
Figure 28. (figure 6 du troisième article). Time-course of ERKs activation by NPY...	193
Figure 29. (figure 7 du troisième article). Effect of BIM, Gö6976, AIP and PD 098056 on NPY-induced CRF synthesis and release.....	194
Figure 30. (figure 7 de la discussion). Schéma représentant les principales voies de signalisation associées ou proposées pour être associées aux récepteurs du NPY présents dans le syncytiotrophoblaste du placenta humain.....	201
Figure 31. (figure 8 de la discussion). Représentation schématique de la régulation par le NPY de la synthèse et de la relâche du CRF par le syncytiotrophoblaste du placenta humain.....	206

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Par soucis d'harmonisation avec les abréviations utilisés dans les articles faisant partie intégrante de cette thèse, la majorité des abréviations choisies, proviennent du terme anglais. Dans ces cas, la séquence sera la suivante : l'abréviation, le terme français ; *le terme anglais*.

AA,	acide arachidonique
ACTH,	corticotrope ; <i>adrenocorticotropic hormone</i>
ADN,	acide désoxyribonucléique
AMPc,	3'5'-adénosine monophosphate cyclique
ARN,	acide ribonucléique
ADP,	adénosine diphosphate
ATP,	adénosine triphosphate
BBM,	membranes d'origine apicale ; <i>brush border membrane</i>
BPM,	membranes d'origine basale ; <i>basal plasma membrane</i>
CaMKII,	kinase dépendante du calcium et de la calmoduline de type II ; <i>calcium calmodulin kinase II</i>
CCE,	courant capacitif ; <i>capacitative calcium entry</i>
CRE(B),	(protéine liant l') élément de réponse de l'adénosine monophosphate cyclique ; <i>cyclic adenosine monophosphate response element (binding protein)</i>
CRF,	facteur de relâche de la corticotrope ; <i>corticotropin-releasing factor</i>
DAG,	diacylglycérol
DHEA,	déhydroépiandrostérone
DHEAS,	sulfate de déhydroépiandrostérone ; <i>dehydroepiandrosterone sulfate</i>
ERK _{1/2} ,	MAP kinases de type ERK 1/2 ; <i>extracellular signal-regulated kinases 1/2</i>
GDP,	guanosine diphosphate
GTP,	guanosine triphosphate
GnRH,	facteur de relâche des gonadostimulines ; <i>gonadotropin-releasing hormone</i>

HCG,	gonadotropin chorionique ; <i>human chorionic gonadotropin</i>
HHS,	hypothalamo-hypophyso-surrénalien
Ins(1,4,5)P ₃ ,	inositol 1,4,5-triphosphate
LH,	hormone lutéinisante ; <i>luteinizing hormone</i>
L-VOCC,	canaux calciques de type L ; <i>L-type voltage-operated calcium channels</i>
NO,	monoxyde d'azote ; <i>nitric oxide</i>
NPY,	neuropeptide Y, où le Y signifie tyrosine
PDK-1,	kinase dépendante des phosphoinositides de type I ; <i>phosphoinositides-dependant kinase-1</i>
PI3-K(s),	kinase(s) de la position D3 des phosphoinositides ; <i>phosphoinositides 3-kinase(s)</i>
PKA,	protéine kinase dépendante de l'adénosine monophosphate cyclique
PKC(s),	protéine(s) kinase(s) C
PLA ₂ ,	phospholipase A ₂
PLC,	phospholipase C
PLD,	phospholipase D
PP,	polypeptide pancréatique
Protéine G,	protéine liant les nucléotides guanyliques
PtdIns(4,5)P ₂ ,	phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PTX,	toxine de <i>Bordetella pertussis</i> ; <i>pertussis toxin</i>
PYY,	peptide YY, où le Y signifie tyrosine
ROCC,	canaux calciques associés à l'activation des récepteurs ; <i>receptor-operated calcium channels</i>

- RT-PCR, TRANSCRIPTASE INVERSE SUIVI D'UNE RÉACTION EN CHAÎNE DE
POLYMÉRISE ; *REVERSE TRANSCRIPTASE-POLYMERASE CHAIN
REACTION*
- SMOCC, CANAUX CALCIQUES RÉGULÉS PAR LES SECONDS MESSAGERS ;
SECOND MESSENGERS-OPERATED CALCIUM CHANNELS
- SOCC, CANAUX CALCIQUES DÉPENDANTS DE LA RELÂCHE DES RÉSERVES
INTRACELLULAIRES DE CALCIUM ; *STORE-OPERATED CALCIUM
CHANNELS*
- TRP, CANAUX CATIONIQUE DE TYPE ROCC ; *TRANSIENT RECEPTOR
POTENTIAL*

Remerciements et dédicace

J'exprime mes remerciements sincères à

La professeure Julie Lafond, ma directrice de recherche, pour sa générosité et sa patience

Lucie Simoneau, pour son aide précieuse, notamment lors de la rédaction des articles et de cette thèse.

Dr. Robert Moreau, pour sa critique constructive des deux derniers articles.

Le FRSQ-FCAR-Santé pour le support financier

Je dédie cette thèse à

Fatiha, ma douce, ma belle

Younes, Antoine et Alexandre, mes amours

Mes parents, mon frère et mes sœurs

Mohammed, mon ami

CHAPITRE PREMIER

INTRODUCTION

L'accouchement, un événement aussi complexe que fascinant, est tributaire d'un long dialogue établis progressivement entre le fœtus, la mère et l'unité placentaire (Challis et Lye, 1994 ; Nathanielsz *et al.*, 1995 ; Smith, 1998). Au sein de l'unité placentaire, le placenta, particulièrement le syncytiotrophoblaste, grâce à la multitude de cytokines, de facteurs de croissance et d'hormones qu'il produit ainsi qu'à la position stratégique qu'il occupe, est voué à un rôle de coordonnateur de cette communication tripartite (Krieger, 1982 ; Petraglia *et al.*, 1996 ; Evain-Brion, 1999).

Normalement, la durée de la grossesse et la maturation fœtale sont synchronisées de sorte que le passage de la vie intra-utérine vers la vie extra-utérine puisse se faire adéquatement (Gluckman *et al.*, 1999). Il n'est donc pas étonnant que la naissance prématurée (grossesse de moins de 37 semaines) soit la première cause de morbidité et de mortalité périnatale (McCormick, 1985 ; Knoches et Doyle, 1993). À cet égard, il est désolant de constater qu'à cause d'une méconnaissance des mécanismes menant à la naissance, aucune amélioration dans la prévention des naissances prématurées n'est survenue au cours des trois dernières décennies (McCormick, 1985 ; Creasy, 1993). Ainsi, la proposition de l'existence d'une horloge placentaire déterminant la longueur de la grossesse (McLaen *et al.*, 1995), au sein de laquelle le CRF jouerait un rôle clef, suscite beaucoup d'intérêt. Selon cette hypothèse, le CRF, un peptide initialement isolé à partir d'extraits hypothalamiques (Spiess *et al.*, 1981 ; Vale *et al.*, 1981) et dont la principale source durant la grossesse est le syncytiotrophoblaste (Riley *et al.*, 1991 ; Perkins et Linton, 1995), serait impliqué dans des boucles amplificatrices menant à

l'accouchement (McLaen *et al.*, 1995 ; Majzoub *et al.*, 1999). D'ailleurs, plusieurs études montrent que la concentration plasmatique maternelle de CRF augmente de façon exponentielle de la mi-grossesse jusqu'à l'initiation des contractions (Sasaki *et al.*, 1984, 1987a,b ; Goland *et al.*, 1986, 1988 ; Campbell *et al.*, 1987 ; Laatikainen *et al.*, 1987b ; Wolfe *et al.*, 1988a ; Jeske *et al.*, 1989 ; Petraglia *et al.*, 1990c). Plusieurs groupes rapportent également qu'en fin de grossesse, la concentration plasmatique de CRF est plus élevée chez les femmes donnant naissance à des prématurés (Warren *et al.*, 1992 ; Petraglia *et al.*, 1995 ; Bisits *et al.*, 1998). Une observation, que McLean *et al.* (1995) ont fait dès le deuxième trimestre, de sorte, que la mesure de la concentration plasmatique de CRF au deuxième trimestre devient un marqueur fiable pour détecter le risque de donner naissance avant terme (McLean *et al.*, 1999).

Bien qu'il soit facile d'argumenter en faveur d'une association fortuite, plusieurs facteurs plaident en faveur d'un rôle actif du CRF. Le premier est son activité utérotonique, d'abord intrinsèque (Quartero et Fry, 1989), puis en synergie avec l'ocytocine (Quartero *et al.*, 1991,1992) et la prostaglandine F_{2α} (Benedetto *et al.*, 1994). De plus, le CRF stimule la relâche de l'ocytocine et des prostaglandines (Jones et Challis, 1989,1991 ; Florio *et al.*, 1996) qui représentent les deux plus puissants facteurs utérotoniques connus. Finalement, la stimulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS) fœtal, favorise la production par le placenta d'œstriol et par le fait même, l'établissement des conditions favorables au travail (Pepe et Albrecht, 1990 ; Liggins, 1994 ; McLean *et al.*, 1995).

Il est clair que le cortisol et la progestérone sont les principaux régulateurs de la relâche du CRF tout au long de la grossesse (Karalis *et al.*, 1996). Néanmoins, des études effectuées sur des explants placentaires ou des trophoblastes en culture ont identifié plusieurs autres sécrétagogues. Ainsi, l'acétylcholine, l'angiotensine II, l'arginine-vasopressine, les catécholamines, le cortisol, l'interleukine-1, le NPY, l'ocytocine et les prostaglandines semblent tous des activateurs de la relâche du CRF (Robinson *et al.*, 1988 ; Jones et Challis, 1989, Petraglia *et al.*, 1989a,c,1990b), tandis que le monoxyde

d'azote (NO) et la progestérone sont les principaux inhibiteurs de sa relâche (Sun *et al.*, 1994 ; Keralis *et al.*, 1996). Toutefois, comme ces études ne portaient pas sur la détermination des mécanismes impliqués dans les effets mesurés, le but de cette thèse a été d'étudier les mécanismes impliqués dans les effets du NPY.

Finalement, pour les besoins inhérents à la nature d'une thèse, le corps du texte sera constitué d'une revue de littérature, des trois articles présentés ainsi qu'une discussion. Cette revue de littérature porte sur la structure fonctionnelle du placenta et sa fonction endocrinienne, centrée sur les trois hormones touchées par l'étude, soit le NPY, le CRF et bien qu'accessoirement, la gonadotropine chorionique (hCG). Étant donné l'importance de la signalisation dans cette étude, une section sur les voies de signalisation des récepteurs couplés aux protéines G sensibles à la PTX a été incorporée à la fin de la section portant sur le NPY.

CHAPITRE SECOND

REVUE DE LITTÉRATURE

1. Formation de l'unité placentaire et ses structures fonctionnelles

1.1. Formation du placenta humain et des membranes annexes

Le placenta est une annexe extra-embryonnaire fœtale provisoire, mais indispensable au développement du fœtus jusqu'au terme de la grossesse. Il joue ce rôle déterminant, appuyé par l'amnios, le chorion lisse et la caduque (fig 1), fournissant ainsi au fœtus un environnement optimal, comblant ses besoins fondamentaux (Robinson *et al.*, 1995). Par exemple, les besoins métaboliques du fœtus sont satisfaits par l'habileté de l'annexe fœtale à transférer gaz, minéraux, nutriments et vitamines de la mère vers le fœtus et les déchets métaboliques du fœtus vers la mère (Schneider, 1991; Hay, 1994; Garnica et Chan, 1996). Le placenta est également doté d'activités enzymatiques pouvant modifier la composition des nutriments provenant de la mère et ainsi pourvoir plus spécifiquement aux besoins du fœtus (Schneider, 1991; Hay, 1994; Garnica et Chan, 1996). Une autre propriété du placenta essentielle à la survie du fœtus, est celle de bloquer l'accès du compartiment fœtal à certains pathogènes de même qu'aux composantes du système immunitaire maternel (Sargent, 1993; Burton et Watson, 1997). À ceci s'ajoute la synthèse et la sécrétion par le placenta d'une multitude de cytokines, de facteurs de croissance et d'hormones capables d'influencer la physiologie fœtale et maternelle (Krieger, 1982 ; Petraglia *et al.*, 1996).

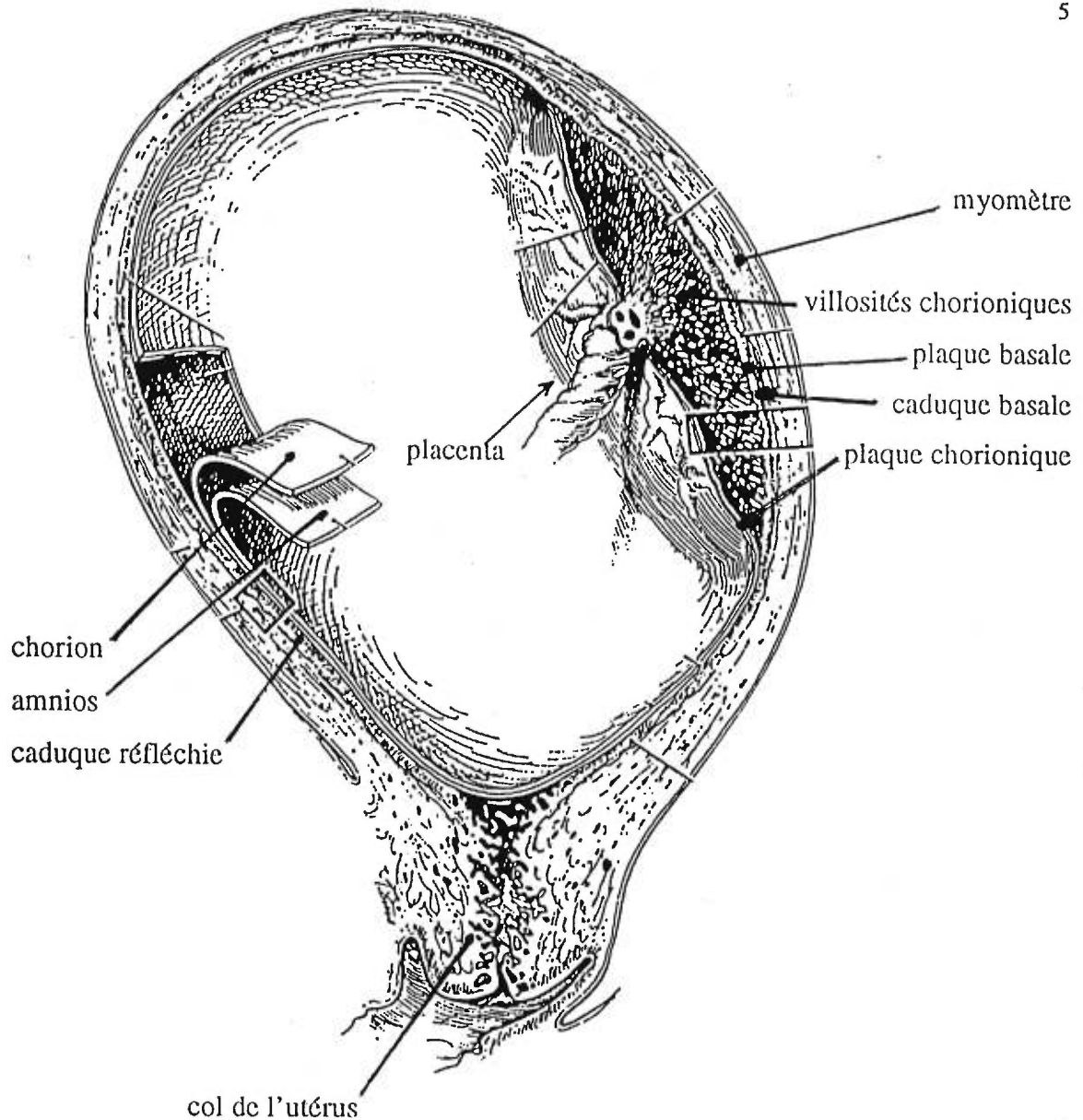


Figure 1. L'unité utéro-placentaire humaine est composée de l'amnios, du chorion, des villosités chorioniques, de la caduque et du myomètre utérin. L'amnios et le chorion forment l'unité amniochorionique qui est, sur une importante surface de la cavité utérine, en étroite association avec la caduque. Dans une portion ayant en son centre ce qui fût le site de nidation, une masse vilieuse importante sépare le chorion de la caduque, il s'agit du placenta. (Tiré de Cunningham *et al*, In: *Williams obstetrics*, 19^e édition, Appleton et Lange, Nortwalk, CT, 1993).

Il n'est donc pas surprenant, que les premières cellules commises soient celles promises à former le placenta et les membranes annexes (amnios et chorion lisse) plutôt que le fœtus (Cross, 1998). Cette étape, correspondant à la formation du blastocyste se produit vers le 4^e jour post-fécondation (souvent assimilée à post-ovulation) (Hertig *et al.*, 1956). Du 6^e ou 7^e jour jusqu'au 9^e jour post-fécondation, le blastocyste s'implante dans la paroi utérine (Hertig *et al.*, 1956). Il est constitué d'une petite masse de cellules (l'embryon en devenir) blottie contre la surface intérieure du trophoblaste, qui est déjà constitué d'une couche cytotrophoblastique interne et d'une couche syncytiotrophoblastique externe (Hertig, 1956). Cette intrusion du blastocyste est permise par une modification de la réceptivité de l'endomètre utérin, amorcée durant la période lutéale tardive, et soutenue grâce à un dialogue moléculaire avec le blastocyste (Beier et Beier-Hellwig, 1998 ; Tabibzadeh, 1998). La pénétration du blastocyste dans l'endomètre est rendue possible grâce à la production par le syncytiotrophoblaste d'enzymes lytiques vis-à-vis de la matrice extracellulaire endométriale (Flamigni *et al.*, 1991 ; Graham et Lala, 1992 ; Strickland et Richards, 1992). Par la suite, une parfaite synchronisation de l'expression de molécules d'adhésion, tant au niveau du syncytiotrophoblaste qu'au niveau de l'endomètre, permet de contrôler d'une part, la progression et d'autre part, la profondeur de l'invasion (Strickland et Richards, 1992). Dès lors, l'organogenèse placentaire débute, elle sera divisée en 2 phases ; la phase prévilleuse-lacunaire (des jours 9 à 13 post-fécondation) durant laquelle apparaissent des lacunes au sein du syncytiotrophoblaste et la phase villeuse (de la 3^e semaine jusqu'à terme).

La phase villeuse est initiée par deux phénomènes parallèles, soit la fusion des lacunes et la prolifération des cellules cytotrophoblastiques qui s'enfoncent dans les travées syncytiales interlacunaires sans les traverser. Conséquences de ce remaniement, les villosités primaires formées par la prolifération radiaire des cytotrophoblastes, de même que le chorion primitif et la muqueuse sont recouverts d'un syncytium constituant une cloison délimitant la chambre intervillieuse primitive (Demir *et al.*, 1989). Par la suite,

une deuxième migration de cellules, cette fois en provenance du mésoblaste extra-embryonnaire, se fait dans l'axe médian des villosités primaires, donnant naissance au mésenchyme vilieux et par le fait même aux villosités secondaires (Demir *et al.*, 1989). Par la suite, la prolifération de certains cytotrophoblastes vilieux et leur migration vers la couche syncytiale recouvrant la caduque maternelle forme les villosités tertiaires. Ces villosités sont aussi appelées villosités crampons, puisque les colonnes et la coque cytotrophoblastique formées créent une assise solide pour le placenta en devenir. La complexification des villosités chorioniques émanant de la portion du chorion surplombant la caduque basale (la partie de la caduque entre l'embryon et le myomètre utérin) et l'élaboration des cotylédons fœtaux, de même que leur système vasculaire donnent au placenta sa structure finale, telle qu'observée lors de la récolte du placenta à terme (Boyd, 1984 ; Demir *et al.*, 1989).

Les deux autres annexes embryonnaires, qui partagent les mêmes origines et le même patrimoine génétique que le placenta et l'embryon, sont l'amnios et le chorion lisse. Le chorion lisse est une involution du chorion vilieux due à un apport sanguin inadéquat entre l'œuf et la cavité abdominale tandis que l'amnios est formé séparément à partir de tissus mésenchymateux. Les deux membranes se fusionnent afin de former une unité amniochorionique (Bryant-Greewood, 1998). Avec le placenta proprement dit, ils forment l'unité placentaire, qui tout au long de la grossesse est en étroite association avec la caduque maternelle (endomètre de grossesse).

1.2. La structure des villosités chorioniques du placenta mature

1.2.1. Les villosités

Récemment, une classification relativement simple des embranchements qui forment les villosités chorioniques a été proposée (Kaufmann *et al.*, 1979 ; Leiser *et al.*, 1985). Dans ce système de classification, les villosités sont divisées en troncs vilieux, en villosités

intermédiaires et en villosités terminales. Les troncs vilieux sont de calibres variables selon qu'ils soient des troncs de 1^{er} ordre (200-400 μm), des ramifications de 2^e ordre (~150 μm) ou de 3^e ordre (80-100 μm). Riches en stroma fibreux, ils jouent essentiellement un rôle de soutien (Kaufmann *et al.*, 1979 ; Leiser *et al.*, 1985). Les troncs vilieux de 1^{er} ordre naissent dans la plaque chorionique, se dirigent vers la plaque basale et sont parcourus par de petites artères et veines. Ces troncs vilieux se divisent de façon dichotomique pour donner naissance aux nombreux troncs vilieux de 2^e ordre, qui en font autant pour donner naissance aux troncs de 3^e ordre qui en atteignant la plaque basale, se courbent et retournent vers la plaque chorionique (Wilkins, 1965). Les vaisseaux sanguins qui les parcourent se divisent également de sorte qu'arrivés au niveau des troncs de 3^e ordre, ne subsistent que des artérioles et des veinules élastiques entourées comme les vaisseaux de gros calibre, d'un plexus de capillaires (Kaufmann *et al.*, 1979 ; Leiser *et al.*, 1985 ; Demir *et al.*, 1997).

Les villosités intermédiaires sont de deux types. Les premières sont de gros calibre (60-200 μm), presque dépourvues de villosités terminales et constituent l'extrémité immature des troncs vilieux de 3^e ordre (Castellucci *et al.*, 1990 ; Demir *et al.*, 1997). Les villosités intermédiaires mature sont plus fines (40-80 μm) et presque inexistantes avant le 3^e trimestre, elles prennent naissance principalement au niveau des troncs de 3^e ordre et de là, elles pointent dans toutes les directions. Ces villosités, qui peuvent se diviser à leur tour en plusieurs branches, portent la presque totalité (95%) des villosités terminales (Castellucci *et al.*, 1990 ; Demir *et al.*, 1997).

L'ensemble des embranchements issus d'un tronc vilieux de 1^{er} ordre forme une structure ressemblant à un saule pleureur à l'envers. Les cotylédons fœtaux les plus simples, retrouvés en périphérie du placenta, seraient constitués d'un seul de ces arbres vilieux, tandis que les plus complexes en contiendraient jusqu'à cinq (Wilkin, 1965).

1.2.2. La villosité terminale et le syncytiotrophoblaste

Les villosités terminales, regroupées en petites grappes le long des villosités intermédiaires matures, sont courtes et minces (40-80 μm ; Kaufmann *et al.*, 1979), elles constituent l'élément fonctionnel où a lieu la presque totalité des échanges endocriniens et métaboliques entre le fœtus et la mère (Bauer *et al.*, 1998). Ces villosités, contrairement au reste de l'arbre vilieux, ne sont pas le produit d'une croissance active de villosités mères, mais seulement des bourgeonnements occasionnés par la pression exercée par les capillaires fœtaux en pleine croissance (Castellucci *et al.*, 1990). À l'instar du reste de l'arbre vilieux, les villosités terminales sont couvertes par un épithélium recouvert de microvillosités de forme cylindrique ($10\text{-}12 \times 10^6$ par mm^2) (Boyd *et al.*, 1968 ; Sandstedt, 1979). Il semble désormais accepté que l'observation de zones dépourvues de microvillosités sur les villosités terminales, particulièrement sur les pointes, soit attribuable à des artéfacts inhérents aux méthodes de fixation (King et Menton, 1975 ; Burton, 1987) et qu'il soit plus prudent de considérer qu'elles sont totalement recouvertes. Le syncytium villositaire est particulier puisqu'il ne possède aucune membrane latérale, sauf aux rares sites de fusion intervillitaire ou aux sites de réparation (Cantle *et al.*, 1987 ; Wang et Schneider, 1987). Ce syncytium ininterrompu recouvre non seulement les villosités chorioniques, mais les plaques chorionique et basale. Par conséquent, l'usage des termes syncytiotrophoblaste et syncytium, qui respectent la réalité anatomique, est préférable au terme "cellules syncytiotrophoblastiques" pourtant d'usage courant. Néanmoins, il ne faut pas en conclure que le syncytiotrophoblaste est une structure homogène, puisque des zones spécialisées formant une mosaïque (fig 2) ont depuis longtemps été décrites (Burgos et Rodriguez, 1966 ; Bernirschke et Kaufmann, 1990).

La plus grande portion du syncytiotrophoblaste a une épaisseur de 2 à 10 μm , elle contient plus ou moins de noyaux et est riche en réticulum endoplasmique rugueux (Dempsey et Zergollern, 1969). Cette zone serait vouée à la synthèse protéique, dont celle d'hormones comme la hCG (Dreskin *et al.*, 1970 ; Hamanaka *et al.*, 1971 ;

Genbacev *et al.*, 1972 ; Beck *et al.*, 1986 ; Unnikumar *et al.*, 1988), le lactogène placentaire, souvent appelé somatomammotropine chorionique (De Ikonicoff et Cedard, 1973 ; Beck *et al.*, 1986 ; Unnikumar *et al.*, 1988), l'ocytocine (Unnikumar *et al.*, 1988) et les opiacées (Laatikainen *et al.*, 1987a). Parsemés dans cette zone, se trouvent des petits îlots dépourvus de ribosomes mais un peu plus riches en mitochondries. Il a été proposé qu'ils s'agisse de sites de synthèse d'hormones stéroïdiennes (Fournet-Dulguerov *et al.*, 1987 ; Bernirschke et Kaufmann, 1990).

Les deux autres zones du syncytiotrophoblaste sont beaucoup plus minces (0.5 – 2 μm) (Fox et Blanco, 1974 ; Sen *et al.*, 1979). La première, nommée zone syncytiovasculaire, est une mince lamelle recouvrant des renflements de capillaires fœtaux (25% de la surface villositaire). La seconde, nommée lamelle syncytiale, recouvre les cellules cytotrophoblastiques ou cellules de Langhans (20% de la surface villositaire). Ces deux zones, à cause des pressions exercées par les structures sous-jacentes, sont dépourvues de noyaux et sont pauvres en organelles (Burton et Tham, 1992). La zone syncytiovasculaire peut arbitrairement être subdivisée en deux portions :

Une portion mince qui est spécialisée dans les échanges d'eau et de gaz, et une portion plus épaisse contenant quelques mitochondries qui est impliquée dans le transport actif des nutriments. Aux abords de la zone syncytiovasculaire et de la lamelle syncytiale se trouvent les nœuds syncytiaux, correspondant aux endroits où s'accumulent les noyaux (Bernirschke et Kaufmann, 1990). La lamelle syncytiale, riche en vésicules de sécrétion et en lysosomes, serait impliquée dans la sécrétion hormonale (Bernirschke et Kaufmann, 1990) et probablement assujettie aux facteurs de relâche sécrétés par les cytotrophoblastes sous-jacents.

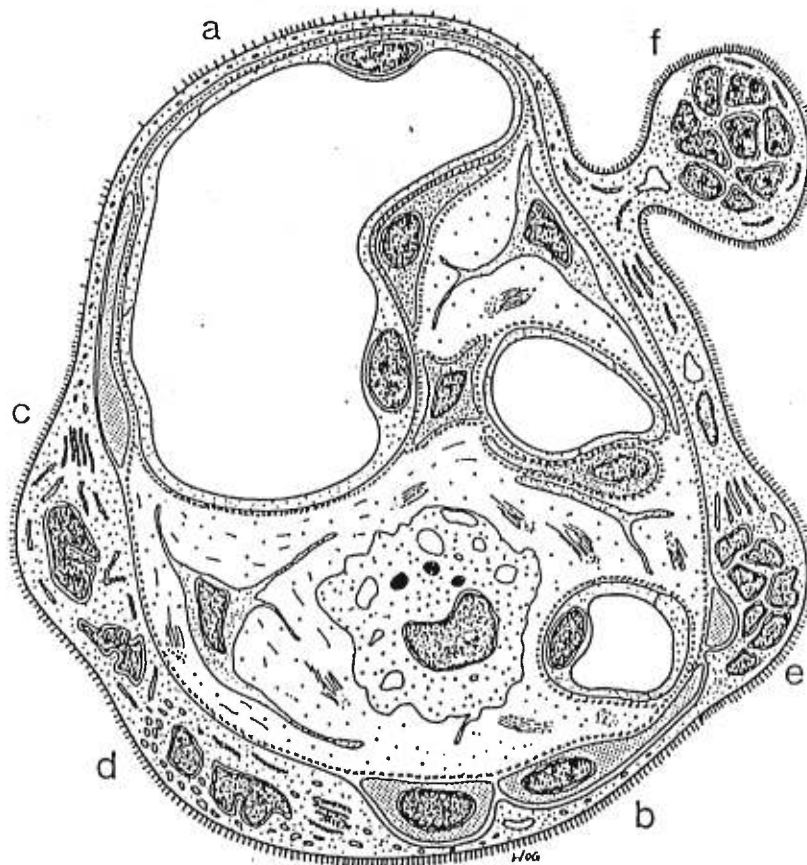


Figure 2. Schéma d'une coupe transversale d'une villosité terminale. a) zone syncytiovasculaire (spécialisée dans le transport), b) lamelle syncytiale (spécialisée dans la sécrétion d'hormones), c) zone riche en ribosomes (spécialisée dans la synthèse protéique), d) zone pauvre en ribosome mais riche en mitochondries (spécialisée dans la synthèse des stéroïdes), e) nœud syncytial (sans fonction précise, accumulation de noyaux) et f) germe syncytial (à terme, un artefact, dans un placenta immature, l'origine des villosités intermédiaires). (tiré de Bernirschke et Kaufmann, Pathology of the human placenta, 1990)

Le syncytiotrophoblaste est donc une structure polarisée; sa membrane plasmique apicale baigne dans le sang maternel, tandis que sa membrane plasmique basale est en contact avec une mince lame basale qui la sépare du stroma villositaire (Burton, 1987). À cette polarité évidente s'ajoute celle retrouvée au niveau des constituants moléculaires des deux membranes, principalement au niveau des protéines. Parmi les protéines retrouvées du côté apical, certaines enzymes telles la guanylate cyclase (Matsubara *et al.*, 1987a) et la phosphatase alcaline (Hulstaert *et al.*, 1973 ; Kameya *et al.*, 1973 ; Matsubara *et al.*, 1987b) sont particulièrement importantes pour la physiologie placentaire. La membrane apicale arbore également des sites de liaison, tels ceux de l'acide folique (Green et Ford, 1984), du facteur de croissance insulinique de type I (IGF-1 et IGF-2) (Fang *et al.*, 1997) et des lipoprotéines de faible densité (Mallasine *et al.*, 1984). Du côté de la membrane basale, on retrouve l'adénylyl cyclase (Whitsett, 1980 ; Matsubara *et al.*, 1987b ; Lafond *et al.*, 1988), l'échangeur sodium-calcium (Kamath et Smith, 1994), la Na^+/K^+ -ATPase (Smith *et al.*, 1977 ; Boyd *et al.*, 1979 ; Whitsett, 1980), la pompe calcique (Fisher *et al.*, 1987 ; Lafond *et al.*, 1991) de même que les récepteurs β -adrénergiques (Whitsett, 1980).

Selon Morrish (1998), Langhans (1887), a été le premier à décrire les cellules cytotrophoblastiques, en plus de spéculer qu'elles soient à l'origine du syncytium. Par la suite, plusieurs études morphologiques ont rendu cette hypothèse irréfutable (Terzakis, 1963 ; Carter, 1964 ; Boyd et Hamilton, 1966). Les cellules de Langhans passent d'un stade non-différencié où elles peuvent incorporer la ^3H -thymidine et se diviser, à un stade intermédiaire où elles ont perdu ces caractéristiques (Tedde et Tedde-Piras, 1978). Les cytotrophoblastes différenciés se distinguent également par leur réticulum endoplasmique rugueux abondant et par la présence de nombreuses mitochondries (Boyd et Hamilton, 1966). Ce n'est d'ailleurs qu'après avoir atteint une densité cytoplasmique semblable à celle du syncytiotrophoblaste qu'ils s'unissent *via* des

jonctions serrées, une étape inévitablement suivie par une dissolution de leur membrane (Contractor *et al.*, 1977 ; Ne'eman *et al.*, 1992). Hormis leur rôle de précurseurs, les cytotrophoblastes ayant atteint un certain degré de différenciation sont la source de plusieurs peptides à activité endocrinienne. Parmi ces peptides, notons le facteur de relâche des gonadostimulines (GnRH) (Khodr et Siler-Khodr, 1978a), l'inhibine (Petraglia *et al.*, 1987a), le NPY (Petraglia *et al.*, 1989c) et la somatostatine (Nishihira et Yagihashi, 1979).

1.3. Formation de la circulation placentaire

La formation des capillaires fœtaux peut se diviser en trois phases ; la phase pré-vasculogénétique (avant le 21^e ou le 22^e jour post-conception), la phase vasculogénétique (de la 4^e à la 26^e semaine) et la phase angiogénétique (de la 26^e semaine jusqu'à terme) (Demir *et al.*, 1989). Durant la phase pré-vasculogénétique, certaines cellules du mésenchyme villositaire se différencient en hémangioblastes et s'alignent pour former des cordons doubles, tandis que d'autres prennent la forme de péricytes (Demir *et al.*, 1989). Au début de la phase vasculogénétique, la plupart des hémangioblastes établissent des jonctions serrées entre lesquelles des interstices se dessinent (Demir *et al.*, 1989). Par la suite, ces espaces s'élargissent et certaines des cellules se décolent et donnent naissance aux cellules hématopoïétiques souches. La circulation intra-villositaire ne s'établit que lorsque les espaces intercellulaires finissent par se joindre pour donner naissance à une lumière en continuité avec le système circulatoire fœtal dans laquelle les cellules hématopoïétiques peuvent circuler sous l'action motrice du cœur du fœtus (Demir *et al.*, 1989). La phase angiogénétique se caractérise par une croissance vasculaire provenant de la prolifération des péricytes plutôt que des hémangioblastes (Demir *et al.*, 1989). L'endothélium villositaire est continu (Heinrich *et al.*, 1976) et ne possède de lame basale complète qu'à partir du dernier trimestre (Demir *et al.*, 1989).

1.4. Les modifications de la circulation maternelle

Les modifications de la circulation maternelle sont nombreuses. Brièvement, durant la période péri-implantation, une réaction s'apparentant à une réaction d'inflammation engendre une augmentation de la perméabilité vasculaire au site d'implantation (Duc-Goiran *et al.*, 1999). Cette perméabilité accrue des vaisseaux, associée aux sécrétions de l'endomètre, est suffisante pour combler les besoins initiaux du blastocyte. Par la suite, certains trophoblastes du stroma villos se différencient et acquièrent un phénotype envahisseur, c'est-à-dire qu'un programme d'expression différentielle de leurs intégrines permet aux trophoblastes de pénétrer profondément dans l'endomètre (Damsky *et al.*, 1992, 1994). Ce faisant, ils atteignent les artères utérines et créent des brèches, de même qu'une perte de tonus permettant au sang maternel de s'écouler dans l'espace intervilloux. Une étude portant sur des utérus prélevés chez des femmes enceintes de 43 à 130 jours a permis d'établir qu'initialement les liens entre les artères utérines et le placenta sont tortueux et constitués d'une succession d'espaces extracellulaires (Burton *et al.*, 1999). Ce ne serait que vers la 8^e semaine post-fécondation que des conduits véritables, mais de petit calibre, se jettent dans les espaces intervilloux. Le calibre de ces artères spiralées augmente ensuite graduellement jusqu'à la 12^e semaine. Ces auteurs en ont conclu qu'il existe une circulation maternelle intervillieuse qui ne sera vraiment établie qu'à partir de la 12^e semaine. De plus, des bouchons formés de trophoblastes seraient présents à l'embouchure des artères spiralées, et y seraient présents jusqu'à la 12^e semaine, freinant ainsi le débit sanguin intervilloux de façon considérable avant ce stade (Jaffé *et al.*, 1997). Donc, bien qu'une circulation utéro-placentaire soit établie dès les premières semaines de grossesse, il semble qu'elle n'atteigne sa plénitude qu'après la 12^e semaine.

2. L'unité placentaire en tant qu'organe endocrinien

Le placenta humain est de type hémomonochorioendothélial, c'est-à-dire que deux barrières cellulaires séparent les sangs maternel et fœtal, soit le syncytiotrophoblaste et

les cellules endothéliales des capillaires fœtaux (Burton, 1987 ; Evain-Brion, 1999). Le syncytiotrophoblaste, de part sa situation stratégique, est voué à être la clef de voûte du réseau d'échange fœto-maternel. Plus précisément, le syncytium accomplit cette tâche *via* les modes de communication autocrinien (avec lui même), paracrinien (avec les cellules voisines) et endocrinien (avec le fœtus et la mère) (Petraglia *et al.*, 1996).

Puisque la sécrétion hormonale trophoblastique est indiscutablement le véhicule de la communication fœto-maternelle, voici une présentation aussi brève que possible du placenta en tant qu'organe endocrinien, incluant une présentation détaillée du NPY et du CRF. L'état des connaissances sur la physiologie NPYergique placentaire se résumant à cinq articles, la majorité des renseignements, en particulier en ce qui concerne la pharmacologie, proviennent de différents systèmes. Par contre, pour le CRF, il existe une vaste littérature qui sera circonscrite pour les besoins de cette présentation. La hCG sera également présentée puisqu'il s'agit d'une des hormones peptidiques purement placentaires et qu'elle constitue le marqueur biochimique utilisé dans cette étude pour suivre la différenciation des cytotrophoblastes.

2.1. Le neuropeptide Y

Le NPY est un polypeptide de 36 acides aminés dont la structure est particulièrement conservée chez les vertébrés (Tatemoto, 1982 ; Larhammar, 1996), une caractéristique qui plaide en faveur de rôles physiologiques primordiaux pour ce peptide. Le NPY forme une famille avec deux autres peptides endocriniens : le PYY et le polypeptide pancréatique (PP). La structure des trois membres de la famille se caractérise par deux hélices antiparallèles reliées par une structure en forme d'épingle (résidus 9-14), appelée le "PP-fold". La première, qui se retrouve du côté amino-terminal (résidus 2-8), est une hélice polyproline, et la seconde à l'extrémité carboxy-terminale (résidus 15-32), est une hélice α (Glover *et al.*, 1985 ; Allen *et al.*, 1987 ; Larhammar, 1996). L'étude de l'organisation chromosomique et de la séquence des gènes qui codent pour ces trois

peptides à travers les espèces, suggèrent un lien d'homologie (Larhammar, 1996). Ainsi, il est proposé qu'ils soient tous des descendants d'un gène ancestral qui se serait dupliqué à une période coïncidant avec l'apparition des poissons à mâchoires pour engendrer le NPY et le précurseur commun du PP et du PYY. Une deuxième duplication qui aurait eu lieu autour de l'apparition des animaux terrestres aurait engendré à son tour le PP et le PYY.

2.1.1. Distribution du NPY, du PYY et du PP

Le NPY a été initialement purifié à partir de cerveaux porcins (Tatemoto *et al.*, 1982), et est l'un des peptides les plus abondants au niveau du système nerveux central (Adrian *et al.*, 1983 ; Allen *et al.*, 1983b). Le neuropeptide est également un abondant co-transmetteur au niveau du système nerveux autonome, surtout dans ses branches sympathiques, mais également dans quelques branches parasympathiques, de même que dans quelques branches non adrénérgiques et non cholinérgiques. Le NPY est ainsi présent dans le système cardio-vasculaire (Allen *et al.*, 1984a) dont le cœur (Allen *et al.*, 1985 ; Corr *et al.*, 1990), le système gastro-intestinal (Ekblad *et al.*, 1984 ; Lee *et al.*, 1985 ; Pettersson *et al.*, 1987 ; Ferri *et al.*, 1988 ; Kawana *et al.*, 1990), le système rénal (Ballesta *et al.* 1984 ; Reinnecke et Forssmann, 1988) et le système respiratoire (Lacroix *et al.*, 1990 ; Martling *et al.*, 1990). De plus, le NPY est synthétisé par plusieurs tissus endocriniens, tels le côlon (Kawana *et al.*, 1990), la médullosurrénale (Oomori *et al.*, 1994), le pancréas (Myrsen et Sundler, 1995) et le placenta (Petraglia *et al.*, 1989c).

Il n'est donc pas étonnant qu'il ait de nombreux rôles au sein de tous ces systèmes (Lundberg et Tatemoto, 1982 ; Allen *et al.*, 1983b ; Stanley *et al.*, 1985 ; MacFadyen *et al.*, 1986 ; Flood *et al.*, 1987 ; Cadieux *et al.*, 1989 ; Pernow et Lundberg, 1989 ; Cadieux *et al.*, 1990 ; Wahlestedt *et al.*, 1992a ; Teyssen *et al.*, 1996). Toutefois, deux fonctions du NPY sont particulièrement intéressantes, notamment à cause de l'analogie souvent évoquée entre l'axe hypothalamo-hypophysaire et l'axe cytotrophoblaste-syncytiotrophoblaste (Waddell, 1993 ; Petraglia *et al.*, 1996), soient les fonctions

gonadotrophique et corticotrophique. En effet, l'une des actions la mieux caractérisée du NPY au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire est la stimulation de la relâche de la LH par l'adénohypophyse suite à une injection du peptide chez le rat (Kalra et Crowley, 1984). Cet effet serait lié à l'activation au préalable de la libération de la GnRH *via* l'activation des L-VOCC (Crowley et Kalra, 1987), ainsi qu'à la potentialisation de son effet sur les cellules gonadotropes (Crowley *et al.*, 1987). Un autre effet connu du NPY est la stimulation de la relâche par l'adénohypophyse de la corticostimuline (ACTH), puisque l'injection du peptide dans le noyau paraventriculaire de rat entraîne l'augmentation de la concentration plasmatique d'ACTH et conséquemment de corticostérone (Wahlestedt *et al.*, 1987). Cet effet du NPY est lié à sa capacité d'induire la relâche du CRF (Haas et George, 1987) et, du moins chez le chien, à potentialiser l'effet du CRF sur la relâche d'ACTH (Inoue *et al.*, 1989). Une autre hormone dont la relâche est stimulée par le NPY, est l'ocytocine (Parker et Crowley, 1993), mais les mécanismes impliqués n'ont pas faits l'objet d'études jusqu'à ce jour.

Le PYY et le PP sont surtout considérés comme des peptides endocriniens devant atteindre leurs cellules cibles *via* la circulation. Cependant, même si le PYY est surtout abondant dans les cellules endocrines de type L du côlon (Lundberg *et al.*, 1982) et dans les cellules A et F du pancréas (Böttcher *et al.*, 1993). Il est également présent dans le système nerveux central, plus particulièrement dans la portion cervicale de la colonne vertébrale, le tronc cérébral et l'hypothalamus (Broomé *et al.*, 1985 ; Ekman *et al.*, 1986). Une étude récente montre également que le PYY est abondamment retrouvé au sein du placenta, des membranes fœtales et de la caduque (Xiao *et al.*, 1998). Ceci suggère que le PYY peut influencer la physiologie fœtale en dehors des périodes post-prandiales. Toutefois, aucune étude à ce jour n'a été effectuée pour étayer cette hypothèse. Le PP, pour sa part, se retrouve exclusivement au niveau des cellules F des îlots de Langerhans (Larsson *et al.*, 1974).

2.1.2. Origine de la hausse de la concentration plasmatique du NPY durant la grossesse

Chez l'humain, la concentration plasmatique du NPY est d'environ 30 pM (Lundberg et al., 1985 ; Pernow et al., 1986 ; Petraglia et al., 1989b). En corrélation avec la concentration de norépinéphrine circulante, la concentration plasmatique du NPY peut quintupler lors d'exercice intense (Lundberg et al., 1985 ; Pernow et al., 1986). Durant la grossesse, la concentration plasmatique du NPY est d'environ 140 pM et ce, peu importe le trimestre (Petraglia et al., 1989b). Toutefois, vers la fin du travail (le col de l'utérus ayant une dilatation de plus de 8 cm) ou lors de l'accouchement, la concentration plasmatique du NPY peut atteindre environ 400 pM (Petraglia et al., 1989b). Une hausse qui n'est pas observée lors d'accouchement par césarienne (Petraglia et al., 1989b) et qui est probablement dûe, bien que cela n'ait jamais été explorée, à une activation du système nerveux sympathique associée à l'état de stress (Mormede *et al.*, 1990 ; Zukowska-Grojec, 1995) de la femme en travail.

Trois observations permettent de proposer que durant la grossesse, le placenta et ses membranes annexes sont à l'origine, excluant la période du travail, de la hausse de la concentration plasmatique du NPY: Premièrement, le système nerveux sympathique n'est pas hyperactif durant la grossesse (Barron *et al.*, 1986), ce qui exclu un débordement du NPY dans la circulation. Deuxièmement, les cytotrophoblastes villositaires (Petraglia *et al.*, 1989c), la caduque et les membranes annexes (Petraglia *et al.*, 1993a) sont tous des sites de production du peptide. Troisièmement, le niveau plasmatique du NPY revient à sa valeur normale deux heures après l'accouchement (Petraglia *et al.*, 1989b).

2.1.3. Rôles du NPY dans le système reproducteur féminin

Dans le système urogénital féminin, le NPY est co-localisé avec la norépinéphrine dans les terminaisons nerveuses sympathiques innervant les artères utérines, le myomètre, les

ovaires, les trompes de Fallope et le vagin (Fried *et al.*, 1986 ; Jorgensen *et al.*, 1989 ; Stjernquist *et al.*, 1991). L'innervation étant surtout abondante en périphérie des vaisseaux sanguins (Jorgensen *et al.*, 1989), où le peptide est potentiellement vasoconstricteur (Morris et Murphy, 1988 ; Fallgren *et al.*, 1989). Cet effet est particulièrement bien caractérisé pour les artères utérines du cochon d'Inde, où le NPY serait responsable de la phase soutenue de la contraction induite par des stimulations électriques (Morris et Murphy, 1988). Chez l'humain, la vasoconstriction induite par le NPY est inexistante ou très faible. Toutefois, le NPY potentialise l'effet vasoconstricteur de divers agonistes (Fallgren *et al.*, 1989 ; Fried et Samuelson, 1991 ; Stjernquist *et al.*, 1991).

Durant la grossesse, il y aurait une légère baisse du contenu en NPY et en norépinéphrine dans l'utérus (Fried *et al.*, 1986 ; Fallgren *et al.*, 1989), mais pas de baisse, ni de la distribution, ni du nombre des terminaisons du système nerveux sympathique (Fallgren *et al.*, 1989). Cette baisse du contenu en NPY ne serait donc pas une baisse de la valeur absolue du peptide, mais la conséquence de l'hypertrophie des muscles lisses. Étant donné, les caractéristiques vasomotrices du NPY, il est possible que cette baisse ait un rôle à jouer dans les modifications du système vasculaire utérin associées à la grossesse. Toutefois, il est possible d'éliminer un rôle utérotonique, puisque chez l'humain, il ne semble pas que le NPY ait d'effet sur les muscles lisses utérins, ni sur ceux des trompes de Fallope (Jorgensen *et al.*, 1989). Finalement, en plus de ces effets probables sur le système vasculaire ovarien, le NPY stimule *in vitro* la synthèse de l'œstrogène par les cellules de la *granulosa* humaine (Barreca *et al.*, 1998). Pris dans leur ensemble ces études suggèrent que le NPY a un rôle dans le contrôle du cycle ovarien.

Les rôles du NPY produit par l'amnios, le chorion lisse et le placenta (Petraglia *et al.*, 1989c, 1993a) sont encore hypothétiques. Ils seraient probablement de nature paracrinienne, puisqu'il a été démontré que le NPY stimule la relâche du CRF (Petraglia *et al.*, 1989a,c) et de l'inhibine (Petraglia et Vale, 1989) par des trophoblastes en culture. Étant donné son effet sur la production d'inhibine (qui dans le cas de l'inhibine B, peut

être formée du dimère $\alpha\beta_B$), et sa localisation avec la sous-unité β_B dans presque tous les tissus utéro-placentaires, il a été proposé que le NPY stimule *in situ* la relâche de l'activine AB ou B (Petraglia *et al.*, 1993a).

Ainsi, le NPY pourrait participer notamment en début de grossesse, c'est-à-dire de la période où la production stéroïdienne placentaire et surrénale est modeste (ceci sera discuté en détail dans la section portant sur le CRF), à la stimulation de la relâche du CRF. De plus, son rôle probable de sécrétagogue de l'activine, un régulateur de la croissance et de la maturation fœtale (Jenkin *et al.*, 1995) et du CRF, confère au NPY un rôle potentiel dans le contrôle de la croissance du fœtus. Finalement, son action vasoconstrictrice devrait donner au NPY une place de choix comme régulateur à la baisse du flux sanguin vers l'endomètre utérin pendant et suite à l'accouchement.

2.1.4. Métabolisme du NPY

Comparativement au métabolisme de certains autres peptides, celui du NPY est peu connu. Néanmoins, certaines études ont démontré une hydrolyse du NPY sous l'action de la dipeptidyl-peptidase IV (Mentlein *et al.*, 1993 ; Medeiros et Turner, 1996). Cette aminopeptidase spécifique à la proline, retrouvée dans la membrane plasmique de plusieurs cellules, clive le dipeptide amino-terminal du NPY et génère un peptide tronqué, le $_{3-36}$ NPY. La signification physiologique de ce clivage est corroborée par la présence du $_{3-36}$ NPY dans le cerveau porcine (Grandt *et al.*, 1992), de même que dans deux tumeurs d'origine pancréatique (Shaw *et al.*, 1993). Dans ce dernier cas toutefois, il est possible qu'il s'agisse d'un traitement du peptide spécifique à la tumeur et non au tissu d'origine. Il est important de souligner, qu'un tel clivage n'inactive pas nécessairement le peptide, puisque le $_{3-36}$ NPY reste un ligand pour certains sous-types de récepteurs, en particulier le type Y_2 (Grandt *et al.*, 1992 et 1996). Ce sujet sera traité dans la section suivante, portant sur les récepteurs du NPY. Le NPY est également un substrat pour l'endopeptidase-24.11 neutre (Medeiros et Turner, 1996) et

l'aminopeptidase P (Mentlein *et al.*, 1993 ; Medeiros et Turner, 1996). Toutefois, bien que les constantes de Michaelis (K_m) de ces deux enzymes pour le NPY soient similaires à celle de la dipeptidyl-peptidase ($10 \mu\text{M}$), leur vitesse maximale de réaction (V_{max}) est environ 100 fois moindre. L'hydrolyse du NPY par ces deux enzymes génère donc une série de fragments dépourvus d'activité biologique.

Dans le placenta, rien n'est encore connu sur le métabolisme du NPY. Par contre, il est reconnu que le placenta possède une activité dipeptidyl-peptidase IV (Püschel *et al.*, 1982 ; Neudeck *et al.*, 1997) et qu'elle se retrouve au niveau des cellules endothéliales de la circulation fœtale, de même que dans le stroma et les trophoblastes villositaires (Gossrau *et al.*, 1987 ; Neudeck *et al.*, 1997). C'est d'ailleurs cette enzyme qui doit être responsable de la production de $_{3-36}\text{PYY}$ par le placenta. Finalement, le placenta possède également une activité endopeptidase neutre (Imai *et al.*, 1994), et peut donc potentiellement dégrader le NPY comme le PYY en fragments inactifs.

2.1.5. Les récepteurs du NPY

Les effets physiologiques du NPY passent par l'interaction du peptide avec ses récepteurs à la surface des cellules-cibles. La première indication d'une hétérogénéité de ces récepteurs est venue d'une étude de Wahlestedt *et al* (1986). Dans cette étude, la contraction de la veine iliaque du cochon d'Inde ne pouvait être provoquée que par l'holopeptide. De plus, l'inhibition de la contraction des canaux déférents, induite par une stimulation électrique du nerf sympathique, pouvait être engendrée par l'application du NPY tronqué. Conséquemment, les récepteurs postsynaptiques responsables du premier effet ont été désignés Y_1 , tandis que les récepteurs présynaptiques responsables du second effet ont été désignés Y_2 (Wahlestedt *et al.*, 1986).

Cette classification, bien que plusieurs sous-types de récepteurs du NPY aient été clonés ou caractérisés depuis, est à première vue toujours valable. Toutefois, le clonage de cinq sous-types chez les mammifères, dont les dits Y_1 et Y_2 , a permis d'affiner notre

connaissance de la biologie du NPY. Ces récepteurs clonés, désignés Y_1 , Y_2 , Y_4 , Y_5 et y_6 seront d'abord décrits, puis ceux qui ont été caractérisés uniquement sur des bases pharmacologiques, le seront par la suite.

2.1.5.1. Les récepteurs clonés

Le clonage d'une protéine est une étape favorisant grandement sa caractérisation. Six récepteurs distincts du NPY ont été clonés, dont cinq chez les mammifères. Le sixième, cloné chez le poisson zèbre, sera également présenté puisqu'il annonce le clonage prochain de son orthologue humain. Parmi ces récepteurs, le sous-type y_6 reste très mal défini et controversé, c'est pourquoi l'Union Internationale de Pharmacologie hésite à lui accorder le Y (Michel *et al.*, 1998).

2.1.5.1.1. Le sous-type Y_1

Le sous-type Y_1 a d'abord été cloné comme récepteur orphelin à partir d'une banque de gènes de cerveaux de rats, en utilisant comme sonde un oligonucléotide correspondant à une portion du sixième passage transmembranaire très conservé chez les récepteurs heptahélicoïdaux (Eva *et al.*, 1990). Il s'agit évidemment d'une dénomination usurpatrice, puisque pour qu'une protéine soit qualifiée de récepteur, elle doit avoir d'une part, un ligand et d'autre part, une action physiologique. Le dit récepteur a ensuite été cloné et caractérisé par plusieurs équipes chez le rat (Krause *et al.*, 1992 ; Petitto *et al.*, 1994), la souris (Eva *et al.*, 1992 ; Nakamura *et al.*, 1995) et l'humain (Herzog *et al.*, 1992 ; Larhammar *et al.*, 1992). Fait intéressant, chez l'humain, trois promoteurs permettant une expression tissulaire différentielle ont été décrits (Ball *et al.*, 1995).

Structurellement, le récepteur Y_1 à l'instar des sous-types qui seront décrits par la suite, est un récepteur heptahélicoïdal. Des études de liaison sur des cellules transfectées avec le récepteur Y_1 ont démontré qu'il a une forte affinité pour le NPY et le PYY, et une

affinité beaucoup plus faible pour le PP (tableau I) (Krause *et al.*, 1992 ; Larhammar *et al.*, 1992 ; Weiland *et al.*, 1995). Toutefois, sa caractéristique principale est de ne pas tolérer de délétion au niveau de la portion amino-terminale du peptide (Wahlestedt *et al.*, 1986 ; Larhammar *et al.*, 1992 ; Weiland *et al.*, 1995). Ce récepteur perd progressivement de son affinité pour le peptide au fur et à mesure que des résidus sont retirés (Weiland *et al.*, 1995). Il est donc permis de croire que les holopeptides du NPY et du PYY sont les principaux ligands physiologiques de ce sous-type de récepteur. Les fragments les plus courts pouvant toujours se fixer au récepteur, peuvent se comporter à doses pharmacologiques comme des agonistes partiels, et même comme des antagonistes, s'ils sont en présence d'holopeptide (Michel *et al.*, 1990). Une autre caractéristique pharmacologique de ce sous-type de récepteur, est son affinité pour des analogues du NPY sur lesquels la glutamine en position 34 est remplacée par la proline correspondante du PP (Fuhlendorff *et al.*, 1990). Une proline à cette position brise l'hélice α du NPY et stabilise une structure secondaire favorisant la liaison de ce dernier au sous-type Y_1 (Beck-Sickinger et Jung, 1995). Récemment, des antagonistes peptidiques, tel que le 1229U91 (Hedge et al., 1995), ou non peptidiques comme le BIBP3226 (Rudolf *et al.*, 1994) et le SR 120819A (Serradeil-Le Gal *et al.*, 1995) ont été introduits comme outils pharmacologiques afin de permettre de mieux caractériser l'implication du sous-type Y_1 dans divers phénomènes physiologiques. Parmi ces outils, seul le BIBP3226 est fiable, puisqu'il est totalement dépourvu d'affinité pour les nouveaux sous-types Y_2 , Y_3 , Y_4 et Y_5 (Jacques *et al.*, 1995 ; Wieland *et al.*, 1995b ; Doods *et al.*, 1996 ; Gerald *et al.*, 1996 ; Gehlert *et al.*, 1996). Le SR 120819A n'a pas encore été mis à l'épreuve. Le 1229U91 est un agoniste pour le sous-type Y_4 humain vis-à-vis de l'inhibition de l'adénylyl cyclase, mais un antagoniste pour le sous-type Y_4 du rat, vis-à-vis l'activation du canal potassique de type GIRK4 (Schober *et al.*, 1998 ; Sun *et al.*, 1998).

Des études d'hybridation *in situ* et de type Northern ont permis de déceler l'ARN messager du récepteur Y_1 dans plusieurs tissus, tels que le cerveau, le cœur, le côlon,

l'endothélium vasculaire, le muscle squelettique, le placenta, les poumons, la rate, les reins et le système gastro-intestinal (Wharton *et al.*, 1993; Nakamura *et al.*, 1995).

Tableau I. Ordre relatif de la puissance des différents agonistes envers les différents sous-types de récepteurs du NPY. (Basé sur l'ensemble des publications citées dans le texte).

SOUS-TYPE	LIGANDS
hY_1	$PYY = NPY = [Pro^{34}]NPY \geq [Leu^{31}, Pro^{34}]NPY \geq [Leu^{31}, Pro^{34}]PYY \gg$ $_{13-36}NPY \geq PP \geq_{3-36}PYY$
hY_2	$PYY = NPY \geq_{3-36}PYY >_{13-36}NPY \gg \gg [Leu^{31}, Pro^{34}]NPY = [Leu^{31},$ $Pro^{34}]PYY \gg PP$
rY_3	$NPY \geq [Leu^{31}, Pro^{34}]NPY \geq_{13-36}NPY \gg PYY = PP = [Leu^{31}, Pro^{34}]PYY$ $=_{3-36}PYY$
hY_4	$PP \gg PYY = NPY \geq [Leu^{31}, Pro^{34}]PYY > [Leu^{31}, Pro^{34}]NPY >_{3-36}PYY$ $>_{13-36}NPY$
hY_5	$NPY = [Leu^{31}, Pro^{34}]NPY = PYY = [Leu^{31}, Pro^{34}]PYY \geq PP \geq_{3-36}PYY$ $\geq_{13-36}NPY$
my_6	$NPY = PYY = [Leu^{31}, Pro^{34}]NPY >_{13-36}NPY \gg \gg PP$
PYY-preferring	$PYY > NPY \geq_{13-36}NPY \gg \gg [Leu^{31}, Pro^{34}]NPY \gg PP$

Note : Cet ordre de puissance relative peut varier légèrement d'une cellule à l'autre et au sein d'une même cellule selon les conditions expérimentales ou l'effet biochimique ou biologique mesuré.

De nombreuses études fonctionnelles ont permis de constater que ce sous-type de récepteur influence une pléiade de voies de signalisation intracellulaire. De façon presque ubiquitaire, le récepteur Y_1 est couplé à l'inhibition de l'adénylyl cyclase préalablement stimulée par le forskolin (Mihara *et al.*, 1989 ; Aakerlund *et al.*, 1990 ; Herzog *et al.*, 1992 ; Krause *et al.*, 1992 ; Larhammar *et al.*, 1992; Nakamura *et al.*, 1995 ; Shigeri *et al.*, 1992, 1995). Il est très souvent couplé à une mobilisation du calcium intracellulaire (Daniels *et al.*, 1989,1991,1994 ;Mihara *et al.*, 1989 ; Aakerlund *et al.*, 1990 ; Krause *et al.*, 1992 ; Larhammar *et al.*, 1992 ; Wahlestedt *et al.*, 1992b ; Shigeri et Fujimara, 1992 ; Nakamura *et al.*, 1995), probablement suite à l'activation de la PLC (Daniels *et al.*, 1989,1991 ; Shigeri *et al.*, 1995). Il a également été démontré

qu'il est couplé à une activation des L-VOCC (Crowley *et al.*, 1990 ; Xiong *et al.*, 1993), des canaux potassiques de type GIRK1 (Brown *et al.*, 1995) et GIRK4 (Sun *et al.*, 1998), et lié à l'inhibition des canaux calciques de type N et Q (Sun *et al.*, 1998). D'autres études montrent une activation des ERK_{1/2} (Nakamura *et al.*, 1995 ; Mannon et Raymond, 1998 ; Zukowska-Grojec *et al.*, 1998) *via* ce sous-type de récepteur, toutefois, des voies différentes d'activation semblent être impliquées. En effet, l'activation au préalable des PI3-Ks (Nakamura *et al.*, 1995), des PKCs (Mannon et Raymond, 1998) ou de l'entrée de calcium *via* les L-VOCC (Zukowska-Grojec *et al.*, 1998) ont indépendamment été décrites. Finalement, une étude montre une activation des PKCs suivie de l'activation de la phospholipase A₂ (PLA₂) (Selbie *et al.*, 1995).

2.1.5.1.2. Le sous-type Y₂

Le sous-type Y₂ humain correspondant au récepteur présynaptique dans classification originale, a été cloné à partir de tissus nerveux, par criblage fonctionnel après expression dans des cellules COS (Gerald *et al.*, 1995 ; Rose *et al.*, 1995 ; Gehlert *et al.*, 1996b). Par la suite, il a été cloné chez la souris, par criblage d'une bibliothèque d'ADN complémentaire de cerveaux, à l'aide d'une sonde provenant du gène humain (Nakamura *et al.*, 1996) et chez le cochon d'Inde (Sharma *et al.*, 1998). Le sous-type Y₂ possède un très faible degré d'homologie au niveau des acides nucléiques avec le sous-type Y₁ (47%), ce qui explique l'échec des tentatives de clonage à partir de l'ADN complémentaire du récepteur Y₁ (Rose *et al.*, 1995).

À l'instar du sous-type Y₁, le sous-type Y₂ humain affiche une affinité comparable pour le NPY et le PYY, et physiologiquement négligeable pour le PP (tableau I) (Gerald *et al.*, 1995 ; Rose *et al.*, 1995 ; Gehlert *et al.*, 1996b). Toutefois, il se distingue du premier par sa tolérance à d'importantes délétions amino-terminales (Wahlestedt *et al.*, 1986 ; Gerald *et al.*, 1995 ; Weiland *et al.*, 1995). De plus, le récepteur Y₂ n'a pas d'affinité pour le BIBP3226 (Rudolf *et al.*, 1994) et a une affinité de l'ordre du μM pour le [Leu³¹,Pro³⁴]NPY (Rose *et al.*, 1995 ; Gehlert *et al.*, 1996b). Ces résultats démontrent

que le NPY et le PYY ainsi que leurs dérivés, suite à l'action de la dipeptidyl peptidase IV, sont les ligands physiologiques du sous-type Y_2 .

Ce sous-type de récepteur est particulièrement abondant dans l'ensemble du système nerveux central (Dumont *et al.*, 1990, 1993). Toutefois, contrairement aux résultats obtenus par des études de liaison et des études fonctionnelles (Singh *et al.*, 1992; Wieland *et al.*, 1995a), l'ARN messager du récepteur ne semble pas être exprimé en périphérie (Gerald *et al.*, 1995 ; Rose *et al.*, 1995 ; Nakamura *et al.*, 1996), indiquant que le sous-type Y_2 périphérique n'est toujours pas cloné. À cet égard, en utilisant des amorces du récepteur Y_2 , l'équipe du Dr. Laburthe a amplifié une séquence ayant 84% d'homologie avec le Y_2 humain (Goumain *et al.*, 1998). Il s'agirait soit de la première localisation postsynaptique du messenger ou d'un premier pas vers le clonage d'un sous-type Y_2 périphérique. Cependant, comme les études d'hybridation de type Southern ne révèlent qu'un gène (Gerald *et al.*, 1995 ; Rose *et al.*, 1995 ; Gehlert *et al.*, 1996b), une divergence, plus importante que les 16%, rapportée par Goumain *et al.* (1998), aurait du être observée.

Comme le sous-type Y_1 , le Y_2 est couplé à l'inhibition de l'adénylyl cyclase préalablement stimulée par le forskolin, de même qu'à la mobilisation du calcium intracellulaire (Gerald *et al.*, 1995 ; Rose *et al.*, 1995 ; Freitag *et al.*, 1995 ; Nakamura *et al.*, 1996). Ce récepteur est également couplé à l'activation du canal potassique de type GIRK4 (Sun *et al.*, 1998), à l'activation d'un influx calcique (Soares Lemos et Takeda, 1995), et lié à l'inhibition des canaux calciques de type N (Ewald *et al.*, 1988 ; Sun *et al.*, 1998) et Q (Sun *et al.*, 1998). La presque totalité de ces effets, comme c'est le cas pour les autres sous-types de récepteurs du NPY (Michel *et al.*, 1998), est abolie par un prétraitement à la PTX (Ewald *et al.*, 1988 ; Freitag *et al.*, 1995 ; Nakamura *et al.*, 1996 ; Sun *et al.*, 1998) ou avec des anticorps qui neutralisent les protéines $G_{i1/2}$ et G_{i3} (Freitag *et al.*, 1995). Singulièrement, dans les cellules CHP-234, le récepteur Y_2 induirait un influx calcique sans l'intermédiaire d'une protéine G insensible à la PTX (Soares Lemos et Takeda, 1995).

2.1.5.1.3. Le sous-type Y₄

Étonnamment, une approche basée sur l'homologie par rapport à certaines portions du sous-type Y₁ a permis de cloner le sous-type Y₄. Il a d'abord été cloné chez l'humain par plusieurs équipes sous deux appellations, soit PP1 (Lundell *et al.*, 1995) et Y₄ (Bard *et al.*, 1995 ; Yan *et al.*, 1996). Le sous-type Y₄ a également été cloné chez le rat (Lundell *et al.*, 1996 ; Yan *et al.*, 1996), la souris, sous le nom de NPYR-D (Gregor *et al.*, 1996) et plus récemment chez le cochon d'Inde (Eriksson *et al.*, 1998).

Lorsque le récepteur Y₄ humain est exprimé dans des cellules COS, sa pharmacologie, comme celle du Y₄ du cochon d'Inde, s'apparente à celle du sous-type Y₁, à l'exception de sa très forte affinité pour le PP (tableau I) (Lundell *et al.*, 1995 ; Bard *et al.*, 1995). De plus, comme le sous-type Y₁, il perd graduellement de son affinité pour un ligand tronqué au fur et à mesure qu'on lui retire des résidus amino-terminaux (Bard *et al.*, 1995 ; Gehlert *et al.*, 1996). Toutefois, le 1229U91, un antagoniste reconnu du sous-type Y₁, semble être un agoniste du type Y₄ humain (Schober *et al.*, 1998). Le récepteur Y₄ du rat, également exprimé dans des cellules COS, démontre beaucoup d'affinité pour le PP, une affinité moindre pour le [Leu³¹, Pro³⁴]NPY et presque aucune affinité pour le NPY et le PYY (Lundell *et al.*, 1996 ; Yan *et al.*, 1996). Étonnamment, le 1229U91 serait un antagoniste du récepteur Y₄ du rat (Sun *et al.*, 1998), indiquant que chez l'humain et le cochon d'Inde, contrairement au rat, le NPY, le PYY et le PP sont des ligands physiologiques. D'autre part, ces études révèlent que le [Leu³¹, Pro³⁴]NPY ne peut plus être considéré comme un agoniste spécifique pour le sous-type Y₁ (Lundell *et al.*, 1996 ; Yan *et al.*, 1996).

En utilisant une hybridation de type Northern, l'ARN messager du récepteur Y₄ a été détecté dans plusieurs tissus (Lundell *et al.*, 1995 ; Bard *et al.*, 1995). Toutefois, une certaine confusion semble exister quant à sa localisation exacte, puisque les patrons de distribution tissulaire rapportés par différentes équipes sont totalement différents. Selon Lundell *et al.* (1995), le sous-type Y₄ serait chez l'humain présent dans le côlon, l'intestin grêle, le pancréas et la prostate, très peu abondant dans le système nerveux

central et absent dans le cœur et le placenta. Cependant, selon Bard *et al* (1995), ce récepteur est abondant dans le système nerveux central, le cœur, l'intestin grêle, mais absent dans le pancréas. Une autre étude, également chez l'humain, a localisé l'ARN messager du récepteur dans l'estomac, l'intestin et la prostate (Gregor *et al.*, 1996). Par transcriptase inverse suivie d'une réaction en chaîne de polymérase (RT-PCR), ces mêmes auteurs ont établi que le messenger, bien qu'en faible quantité, est exprimé dans diverses zones du cerveau et du tronc cérébral (Gregor *et al.*, 1996). Chez la souris, l'ARN messager du récepteur est présent dans le cœur et l'intestin grêle, mais absent du cerveau et de tous les autres organes testés (Gregor *et al.*, 1996). Deux études, utilisant une méthode d'hybridation *in situ* de l'ARN messager du sous-type Y₄, ont confirmé la localisation du récepteur dans certains noyaux du tronc cérébral (Larsen et Kristen, 1997), de même que dans l'intestin grêle et le côlon (Goumain *et al.*, 1998).

Lorsque le sous-type Y₄ humain est exprimé dans des cellules CHO (Lundell *et al.*, 1995) ou des fibroblastes (Bard *et al.*, 1995), il est couplé à l'inhibition de l'adénylyl cyclase stimulée par le forskolin. Lorsque exprimé dans des fibroblastes, il est également couplé à une mobilisation du calcium intracellulaire (Bard *et al.*, 1995). Finalement, lorsqu'il est exprimé dans des oocytes de grenouille (*xenopus*), le sous-type Y₄ active le canal potassique de type GIRK4, tandis que lorsqu'il est exprimé dans des cellules HEK293, il inactive les canaux calciques de type N et Q (Sun *et al.*, 1998).

2.1.5.1.4. Le sous-type Y₅

Un récepteur hypothalamique, correspondant assez bien au profil pharmacologique attendu du récepteur responsable de l'effet orexigène du NPY (Stanley *et al.*, 1992), a été cloné chez le rat (Gerald *et al.*, 1996), l'humain (Hu *et al.*, 1996 ; Borowsky *et al.*, 1998), le chien et la souris (Borowsky *et al.*, 1998). Ce sous-type, nommé Y₅, se distingue du Y₁ par son affinité pour le PP et sa tolérance relative aux petites délétions amino-terminales. En plus, le BIBP3226 ne semble pas être un antagoniste de ce récepteur et le [_D.Trp³²]NPY, qui est sans effet sur les autres sous-types de récepteurs du

NPY, est un bon agoniste pour le Y₅ (Gerald *et al.*, 1996 ; Hu *et al.*, 1996). Le Y₅ se retrouve principalement dans le système nerveux central (Gerald *et al.*, 1996), mais également dans le rein (Bischoff *et al.*, 1997) et dans le côlon (Feletou *et al.*, 1998). Lorsqu'il est exprimé dans des cellules 293, ce récepteur est couplé à l'inhibition de l'adénylyl cyclase (Gerald *et al.*, 1996).

2.1.5.1.5. Le sous-type y6

Le dernier récepteur cloné chez les mammifères, est le y6, qui fût d'abord cloné chez la souris (Weinberg *et al.*, 1996 ; Gregor *et al.*, 1996b), où il avait été désigné Y₅, puis chez le lapin (Matsumoto *et al.*, 1996) et l'humain (Gregor *et al.*, 1996b ; Matsumoto *et al.*, 1996 ; Rose *et al.*, 1997). Toutefois, il serait un pseudogène chez les primates, incluant l'humain, puisqu'une délétion au niveau de sa troisième boucle intracellulaire le rend incapable de lier ses ligands (Gregor *et al.*, 1996b ; Matsumoto *et al.*, 1996 ; Rose *et al.*, 1997). Sa pharmacologie est sujette à controverse, puisque deux études lui donnent un profil semblable à celui du Y₅, sauf pour sa très faible affinité pour le PP (Weinberg *et al.*, 1996 ; Matsumoto *et al.*, 1996), alors qu'une autre, au contraire, le propose comme étant un récepteur de type PP₂ (Gregor *et al.*, 1996b). Le sous-type y6 est abondant dans l'hypothalamus de la souris, ce qui a incité l'une des équipes à le proposer comme récepteur orexigène (Weinberg *et al.*, 1996). Chez le lapin, le gène est également exprimé dans le système nerveux central, dont l'hypothalamus, mais aussi dans des tissus périphériques, comme les intestins et les surrénales, mais pas dans le cœur et le muscle squelettique (Matsumoto *et al.*, 1996). Chez l'humain, le pseudogène serait exprimé dans de nombreux tissus, tels les intestins, la rate, la prostate et les testicules, et contrairement au lapin, dans le cœur et le muscle squelettique (Gregor *et al.*, 1996 ; Matsumoto *et al.*, 1996). D'ailleurs, l'expression d'un récepteur inutile laisse perplexes, il s'agirait probablement d'une mutation ayant permis au gène codant pour un récepteur du NPY d'acquiescer une nouvelle fonction (Matsumoto *et al.*, 1996). Le terme de récepteur est d'ailleurs peut-être un peu précoce pour ce sous-type, puisque actuellement aucune fonction biologique ne lui a été attribuée.

2.1.5.1.6. *Le sous-type zYa*

Récemment, un nouveau sous-type a été cloné chez le poisson zèbre *Danio rerio*, et a été désigné zYa (Starbäck *et al.*, 1999). Une caractérisation pharmacologique lui confère une pharmacologie s'apparentant au sous-type Y₅, à l'exception d'une faible affinité pour le [D-Trp³²]NPY, un agoniste reconnu de ce sous-type (Gerald *et al.*, 1996). Bien que ce récepteur possède 46-50% d'homologie avec les sous-types Y₁, Y₄ et y₆, une analyse plus poussée de l'organisation du gène et de son positionnement chromosomique laisse présager qu'il ne s'agit pas de l'orthologue de l'un de ces gènes, mais plutôt de celui d'un gène encore non trouvé chez les mammifères.

2.1.5.2. *Les récepteurs non-clonés*

2.1.5.2.1. *Le sous-type Y₃*

L'existence d'un sous-type Y₃, qui se caractérise par son absence d'affinité pour le PYY, bien que non-cloné, semble bien être acceptée (Grundemar *et al.*, 1991 ; Nörenberg *et al.*, 1995). Néanmoins, dans l'attente qu'il soit cloné ou qu'un antagoniste spécifique lui soit trouvé, il est suggéré d'user de prudence avant de le désigner comme récepteur (Michel *et al.*, 1998). Ce récepteur se retrouverait au niveau cardiaque (Balasubramaniam *et al.*, 1990), dans les cellules chromaffines bovines (Wahlestedt *et al.*, 1992b) et dans le tronc cérébral (Grundemar *et al.*, 1991 ; Lee et Miller, 1998). Une certaine confusion semble toutefois exister en ce qui a trait à sa pharmacologie. Toutefois, toutes les études portant sur ce récepteur s'entendent sur le fait qu'il n'a pas d'affinité pour le PYY. Une étude lui prête une bonne affinité pour le [Leu³¹, Pro³⁴]NPY et le ₁₃₋₃₆NPY (Wahlestedt *et al.*, 1992b), une autre, seulement envers le ₁₃₋₃₆NPY (Grundemar *et al.*, 1991), tandis qu'une troisième ne lui trouve d'affinité pour aucun de ces analogues (Lee et Miller, 1998).

Le récepteur exprimé à la surface des cellules chromaffines bovines serait couplé à un influx de calcium, mais non à l'inhibition de l'adénylyl cyclase (Wahlestedt *et al.*, 1992b). Dans les phéochromocytomes, ces récepteurs sont couplés à l'inhibition des L-VOCC et des N-VOCC (McCullough *et al.*, 1998). Le sous-type Y₃ dans le *tractus solitarius* est couplé à l'inhibition de l'adénylyl cyclase (Ny et Grundemar, 1997) et à l'inhibition des courants calciques (Lee et Miller, 1998). Finalement, dans l'aorte de porc, il est couplé à la mobilisation du calcium intracellulaire (Erdbrugger *et al.*, 1993).

2.1.5.2.2. Le sous-type " PYY-preferring "

La présence d'un dernier sous-type dénommé *PYY-preferring* a été proposée par Laburthe *et al* (1986). Toutefois, cette appellation est controversée puisqu'elle est basée sur une différence d'affinité plutôt modeste entre le PYY et le NPY de l'ordre d'un demi à un Log (Laburthe *et al.*, 1986). Ce récepteur serait présent dans les cryptes de l'intestin grêle de rat (Laburthe *et al.*, 1986 ; Voisin *et al.*, 1991), dans les adipocytes de chien (Castan *et al.*, 1992) et dans la ligné cellulaire PKSV-PCT, issue de tubule contourné proximal de rein de souris transgénique (Voisin *et al.*, 1993). Une seule autre équipe a décrit un récepteur semblable, et l'a désigné *PYY-preferring* Y₂ (Teyssen *et al.*, 1996), ce qui est en accord avec les dernières recommandations de l'Union International de Pharmacologie (Michel *et al.*, 1998). En effet, hormis son affinité différentielle pour le NPY et le PYY, le sous-type *PYY-preferring* a la même pharmacologie que le sous-type Y₂ précédemment décrit. Du point de vue fonctionnel, deux études montrent que ce récepteur inhibe l'adénylyl cyclase (Voisin *et al.*, 1993,1996).

2.1.6. Signalisation des récepteurs liés aux protéines G hétérotrimériques sensibles à la toxine de *Bordetella pertussis*

Les récepteurs du NPY font partie de la superfamille des récepteurs couplés à des protéines G (Kassis *et al.*, 1987 ; Motulsky et Michel, 1988 ; Mihara *et al.*, 1989 ; Lobaugh et Blackshear, 1990 ; Herzog *et al.*, 1992 ; Shigeri et Fugimoto, 1992 ; Michel *et al.*, 1998). Plus précisément, ils sont couplés aux protéines G sensibles à la PTX (Michel *et al.*, 1998), et par le fait même à plusieurs voies de signalisation (Offermanns et Simon, 1996). Les nombreux mécanismes sous-jacents à la spécificité de la réponse cellulaire ne seront pas traités à leur juste valeur puisqu'ils pourraient à eux seuls constituer une thèse. Ils incluent l'expression différentielle, selon les cellules ou l'état physiologique d'une cellule, des récepteurs, des protéines G, des effecteurs et des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'agoniste (Offermanns et Schultz, 1994 ; Böhm *et al.*, 1997). La spécificité de la réponse est également complexifiée par la promiscuité des interactions récepteur(s)-protéine(s) G (Offermanns et Schultz, 1994 ; Raymond, 1995 ; Gundermann, 1997), et la compartimentation des éléments exprimés dans une cellule (Neubig, 1994 ; Offermanns et Schultz, 1994 ; Raymond, 1995 ; Offermanns et Simon, 1996 ; Schillace et Scott, 1999). À cet égard plusieurs types de compartimentation ont été décrits, il y a évidemment la macrocompartimentation (membrane apicale vs basale), mais aussi la microcompartimentation (cavéoles, complexe d'adhésion focale, cônes de croissance, vésicules d'internalisation et de recyclage), la nanocompartimentation occasionnée par de nombreux types d'interactions protéine-protéine (oligomérisation et interaction avec des protéines adaptatrices, d'ancrage, d'échafaudage et du cytosquelette) (Chun *et al.*, 1994 ; Lisanti *et al.*, 1994 ; Pawson, 1994 ; El Mabrouk *et al.*, 1996 ; Harrison, 1996 ; Lohse *et al.*, 1996 ; Shaw, 1996 ; Hébert et Bouvier, 1998 ; Mochly-Rosen et Gordon, 1998 ; Whitmarsh et Davis, 1998). Finalement, la spécificité de la réponse cellulaire peut également résulter des modifications post-transcriptionnelles régulées, telles que la phosphorylation et la palmitoylation des protéines impliquées (Bouvier *et al.*, 1994 ; Raymond, 1995 ; Freedman et Lefkowitz, 1996 ; Offermanns et Simon, 1996 ; Böhm *et al.*, 1997). Tous ces mécanismes confondus forment ce qui peut être appelé le "facteur tissulaire", une

entité souvent négligée, qui pourtant est le déterminant fondamental de l'effet final qu'aura un agoniste dans un système donné (Raymond, 1995 ; Kenakin, 1996 ; Offermanns et Simons, 1996; Böhn *et al.*, 1997).

2.1.6.1. Structure des récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques

Les récepteurs de cette superfamille (plus de 1000 membres) sont des protéines membranaires intégrales, constituées de sept hélices alpha unies par une alternance de boucles intracellulaires et extracellulaires, dont l'extrémité amino-terminale est extracellulaire et l'extrémité carboxy-terminale est cytosolique (Dohlman *et al.*, 1991 ; Strader *et al.*, 1994). L'ensemble de ces hélices forme, en raison de leurs interactions avec la membrane ainsi qu'entre elles, une structure compacte mais mobile (Baldwin, 1993).

Malgré cette similarité de structure, ces récepteurs démontrent une sélectivité extraordinaire vis-à-vis de ligands aussi diversifiés que des acides aminés, des amines biogènes, des ions, des lipides, des nucléotides, des odorants, des peptides et des protéines (Offermanns et Simon, 1996). L'interaction ligand-récepteur diffère évidemment beaucoup entre de petites molécules, telles les monoamines et les peptides tel le NPY, malgré le fait que leur mode de transfert de l'information est assez similaire. Dans le cas du NPY et du récepteur Y₁, tout comme la plupart des peptides, l'interaction débute par des interactions de nature électrostatique entre des résidus chargés du peptide et plusieurs résidus des boucles extracellulaires du récepteur (Kirby *et al.*, 1993 ; Walker *et al.*, 1994 ; Sautel *et al.*, 1996 ; Berthold et Bartfai, 1997 ; Du *et al.*, 1997). En tenant compte de ces interactions, ces auteurs proposent que le NPY s'oriente de façon à ce que ses résidus 1 et 33-36 soient en intime relation avec plusieurs régions des domaines transmembranaires du récepteur. Notamment, une interaction essentielle à l'activation du récepteur, impliquant la tyrosine 36 du peptide et la glutamine 219 située sur la 5^e hélice du récepteur. Il est d'ailleurs proposé que cette interaction particulière, stabilise une conformation du récepteur exposant les régions aptes à interagir avec les protéines G

hétérotrimériques (un point discuté ultérieurement). Mentionnons toutefois que plusieurs études de mutagenèse dirigée effectuées sur divers récepteurs ont identifié les portions juxtamembranaires sous les hélices 5, 6 et 7, particulièrement la troisième boucle intracellulaire, comme étant les principales régions d'un récepteur impliquées dans le couplage avec les protéines G (Kolbika *et al.*, 1988 ; Dohlman *et al.*, 1991 ; Luttrell *et al.*, 1993 ; Strader *et al.*, 1994 ; Guan *et al.*, 1995).

2.1.6.2. Structure et rôle des protéines G

Les protéines G hétérotrimériques sont composées de trois polypeptides, une sous-unité β , une sous-unité γ et une sous-unité α qui lui donne son nom. Par exemple, une protéine G formée des sous-unités $\alpha_o\beta_2\gamma_5$ sera désignée G_o , au même titre qu'une autre formée des sous-unités $\alpha_o\beta_1\gamma_{12}$.

Les sous unités α , au nombre de 21, sont des guanine triphosphatases (GTPase) divisées en quatre familles, dont les prototypes sont les G_i (G_{i1} , G_{i2} , G_{i3} , G_{gust} , G_{o1} , G_{o2} , G_{o3} , G_{t-c} , G_{t-r} , et G_z), la G_q (G_q , G_{11} , G_{14} et G_{16}), les G_s (G_{olf} , G_{sL1} , G_{sL2} , G_{ss1} et G_{ss2}) et la G_{12} (G_{12} et G_{13}) (Simon *et al.*, 1991 ; Nürnberg *et al.*, 1995 ; Raymond, 1995 ; Offermanns et Simon, 1996). Deux toxines bactériennes sont également couramment utilisées pour identifier certains membres de la familles des protéines G hétérotrimériques. Il s'agit de la toxine de *Vibrio cholerae* et de la PTX. La première procède à l'ADP-ribosylation et à l'activation de la sous-unité α des protéines G_s et G_t (Spiegel, 1987 ; Barritt et Gregory, 1997). La seconde procède à l'ADP-ribosylation et à l'inhibition des protéines G_i , G_o et G_t (Spiegel, 1987 ; Barritt et Gregory, 1997). Plusieurs sous-unités α sont ubiquitaires et une cellule donnée possède généralement de 5 à 10 de ces sous-unités (Offermanns et Simon, 1996). Ces sous-unités sont formées d'un domaine arborant l'activité GTPasique et d'un domaine hélicoïdal flexible entre lesquels la molécule de GTP vient se blottir (Coleman *et al.*, 1994 ; Lambright *et al.*, 1994). Le rôle principal de la sous-unité α est de transmettre l'information entre le récepteur et certains effecteurs (Spiegel, 1987).

Les sous unités β , au nombre de 6, et γ , au nombre de 12, forment des dimères indissociables *in vivo* (Offermanns et Schultz 1994; Neer, 1995 ; Clapham et Neer, 1997). Bien que toutes les combinaisons ne soient pas possibles, la conséquence de l'hétérogénéité de celles qui le sont, semble plus critique pour la spécificité du couplage récepteur-proteine G, que pour le couplage protéine G-effecteur (Kleuss *et al.*, 1992, 1993 ; Offermanns et Schultz 1994; Neer, 1995 ; Clapham et Neer, 1997). L'un des principaux rôles du dimère, hormis la régulation de l'activité de certains effecteurs, serait de présenter la sous-unité α au récepteur (Hildebrandt, 1997). Un autre rôle du dimère est l'amarrage de protéines arborant un domaine d'homologie à la pleckstrine, telles que les kinases des récepteurs couplés aux protéines G de type 2 et 3 (GRK1 et GRK2) (Lohse *et al.* 1996).

La conformation active d'un récepteur est à proprement dit un facteur d'échange des nucléotides. Il permet, en induisant un changement de conformation dans la portion carboxy-terminale de la protéine G, l'échange du GTP hydrolysé par une nouvelle molécule de GTP (Gilman, 1987 ; Lambright *et al.*, 1994 ; Birnbaumer et Birnbaumer, 1995 ; Neer, 1995). L'entrée du GTP dans la cavité de la sous-unité α , vient déstabiliser la protéine G entraînant ainsi la dissociation de la sous-unité α et du dimère $\beta\gamma$, un événement assimilé à son activation (Gilman, 1987 ; Conklin et Bourne, 1993 ; Birnbaumer et Birnbaumer, 1995). Les deux composantes ainsi libérées, sont des molécules capables individuellement ou en collaboration de moduler l'activité d'enzymes effectrices (Neer, 1995 ; Clapham et Neer, 1997). C'est d'ailleurs l'hydrolyse du GTP et la réassociation de la sous-unité α et du dimère $\beta\gamma$ qui met fin au cycle (Conklin et Bourne, 1993 ; Lambright *et al.*, 1994, 1996 ; Birnbaumer et Birnbaumer, 1995 ; Mixon *et al.*, 1995).

2.1.6.3. Modèle d'activation des récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques.

2.1.6.3.1. Le complexe ternaire

Selon le modèle traditionnel, le transfert du signal des récepteurs heptahélicoïdaux vers les protéines G est tributaire de la formation d'un complexe ternaire (De Léan *et al.*, 1980). Le tout débute par la formation d'un complexe agoniste-récepteur ou récepteur-protéine G. Vient ensuite la formation du complexe ternaire agoniste-récepteur-protéine G, un complexe transitoire pour lequel la liaison agoniste-récepteur est maximale, ce qui est un préalable à la promotion de la conformation active du récepteur (De Léan *et al.*, 1980). Bien que la formation d'un tel complexe soit indiscutable, ce modèle que l'on peut qualifier d'inductif n'arrive pas à expliquer un bon nombre d'observations expérimentales. C'est pourquoi, il a été passablement raffiné au cours des cinq dernières années.

2.1.6.3.2. Le complexe ternaire allostérique

La première retouche significative au modèle ternaire propose une alternance spontanée du récepteur entre une forme inactive (R) et une forme active (R*) capable d'interagir avec une protéine G (Samama *et al.*, 1993). Dans ce modèle, nommé le modèle ternaire allostérique, les diverses molécules pouvant se fixer au récepteur peuvent, selon leur affinité relative pour les formes R et R*, être un agoniste inverse, un antagoniste ou un agoniste (Chidiac *et al.*, 1994 ; Kenakin, 1997). Ce modèle implique qu'une molécule, possédant une activité intrinsèque faible, c'est-à-dire une affinité légèrement supérieure pour R*, puisse, dans un système où l'équilibre tend déjà vers R*, ne pas générer d'activité mesurable. Par contre, dans un système où l'équilibre naturel tend vers R, la même molécule peut entraîner un effet important. Conclusion, l'activité d'un ligand dans un tissu donné n'est pas une caractéristique purement intrinsèque, puisque l'identité et l'état physiologique du tissu (facteur tissulaire) est un déterminant de l'effet final (Raymond, 1995 ; Kenakin, 1996). L'observation ayant permis à Samama *et al.* (1993)

de formuler le modèle, est celle d'une corrélation positive entre l'activité intrinsèque des agonistes et leur affinité pour des récepteurs mutants constitutivement actifs. Ce que montre cette étude est fondamental dans la conceptualisation du modèle, puisque sans mettre de côté la possibilité d'un mode inductif d'activation des récepteurs, elle démontre qu'il existe un mécanisme de sélection de conformation.

2.1.6.3.3. L'aiguillage ou la promiscuité contrôlée

Malgré sa complexité, même le modèle ternaire allostérique n'explique pas certaines données expérimentales. L'une d'elles est l'aiguillage par différents agonistes d'un même récepteur, des interactions du récepteur avec différentes protéines G (Kenakin, 1995 ; Leff *et al.*, 1997). Parmi les exemples d'aiguillage, celui de l'ordre d'affinité inversé du PACAP-27 et du PACAP-38, dans les cellules LLC-PK1 transfectées avec le récepteur PACAP I, pour l'activation de l'adénylyl cyclase et de la PLC (Spengler *et al.*, 1993) est un classique. Un autre exemple est celui des récepteurs α_2 -adrénergiques exprimés dans les cellules CHO, qui en présence d'épinéphrine s'associent aux protéines G_i et G_s , mais seulement au protéine G_i en présence d'oxymétazoline (Eason *et al.*, 1994). Ces exemples montrent qu'un ligand peut démontrer de l'affinité pour une conformation du récepteur interagissant avec une ou des protéines G, tandis qu'un autre peut démontrer une affinité pour une conformation apte à interagir avec une ou d'autres protéines G. Ces exemples suggèrent également l'existence de plusieurs conformations actives (R^* , R^{**} , ...) pour un même récepteur (Kenakin, 1995 ; Gundermann *et al.*, 1996 ; Leff *et al.*, 1997).

2.1.6.3.4. Le modèle d'interaction séquentielle

Le modèle d'interaction agoniste-récepteur le plus plausible, valable autant pour les monoamines que pour les peptides, prévoit une stabilisation séquentielle de conformations menant vers la conformation responsable de l'effet (Gether et Kobilka, 1998). Dans ce modèle, qui est une complexification des modèles de sélection de conformations (Samama *et al.*, 1993), nous sommes près d'un retour au modèle d'induction. En effet, l'activation du récepteur est due à la transition au hasard et spontanée du récepteur entre une forme R et R*, mais chacun des états de transition est séquentiellement stabilisé par une nouvelle interaction entre un groupe structural de l'agoniste et des acides aminés des hélices transmembranaires du récepteur. Ainsi un agoniste pour une fonction donnée d'un récepteur, en stabilisant un premier état de transition, réduit l'éventail des oscillations possibles du récepteur, et par le fait même, augmente la probabilité d'atteindre une deuxième conformation favorable à l'établissement d'une deuxième interaction, puis une troisième, ... jusqu'à l'atteinte d'une conformation compétente à interagir avec une ou des protéines G.

Comme le modèle ternaire le suggérait implicitement et comme le modèle ternaire cubique le suggérait explicitement, la sélection séquentielle permet aux protéines G d'interagir avec certaines conformations d'un récepteur inoccupé par un ligand. Ce faisant, les protéines G stabilisent ces états de transition et viennent ainsi modifier la probabilité d'interaction agoniste-récepteur et la cinétique de la transition vers l'état capable de lui transmettre un stimulus (Kenakin, 1996 ; Gether et Kobilka, 1998).

2.1.6.3.5. Intégration des différents modèles

Les récepteurs heptahélicoïdaux existeraient sous plusieurs conformations, et leur équilibre en absence d'agoniste, serait régi par des facteurs tissulaires. Ceci explique le niveau d'activité basale variable de certains récepteurs dans des tissus ou des situations physiologiques donnés. Lorsqu'une molécule vient modifier cet équilibre vers une conformation du récepteur favorable à l'établissement d'un effet, il s'agit d'un agoniste de cet effet. Si une molécule vient stabiliser une autre conformation du récepteur, qu'elle soit inapte à transmettre d'effet ou qu'elle en induise un autre, il s'agit d'un agoniste inverse du premier effet. Théoriquement, une molécule peut donc être un agoniste d'une fonction d'un récepteur et un agoniste inverse d'une autre. Une vision purement probabilistique a récemment été proposée par Onaran et Costa (1997) puis reprise par Kenakin (1997). Ce modèle, bien que n'étant pas à l'origine élaboré à partir de données biochimiques, illustre extraordinairement bien ce phénomène (fig 3).

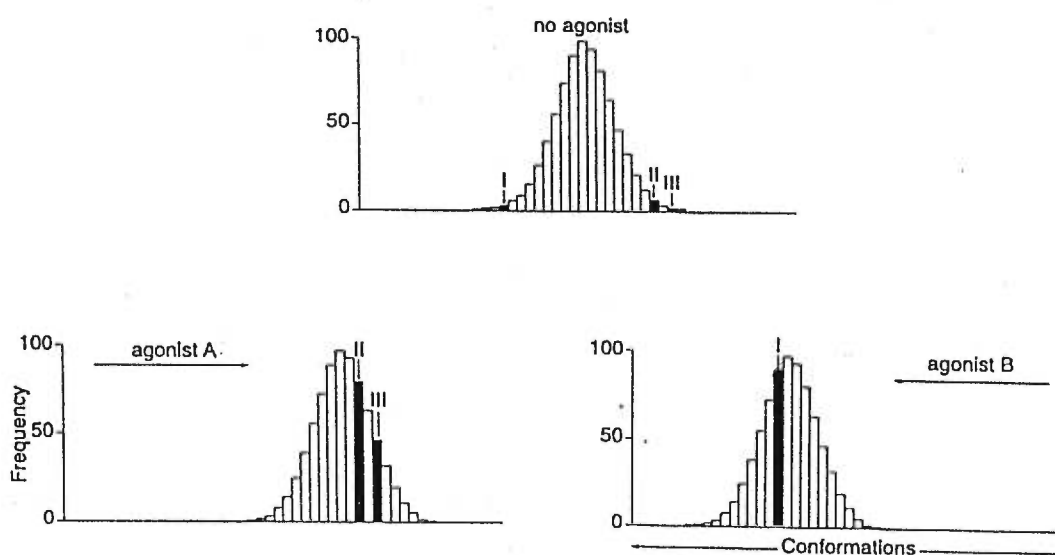


Figure 3. Modèle d'Onaran et Costa (1997), appliqué à un récepteur ayant trois conformations actives (I, II et III). En absence d'agoniste, des conformations intermédiaires sont favorisées aux dépens des conformations actives. En présence de l'agoniste A, les conformations II et III sont favorisées, tandis qu'en présence de l'agoniste B, la conformation I est favorisée (tiré de Kenakin, 1997).

2.1.6.4. Les effecteurs dont l'activité est modulée par les récepteurs couplés aux protéines G sensibles à la toxine pertussique.

Les protéines G hétérotrimériques sensibles à la PTX sont les protéines G_i , G_o et G_t (Spiegel, 1987 ; Barritt et Gregory, 1997). Puisque ces protéines ont été associées à la modulation de l'activité d'une pléiade d'effecteurs et ultérieurement à de multiples kinases dont les PKCs, les ERKs et les CaMKII.

2.1.6.4.1. Voies d'activation des protéines kinases C par les récepteurs couplés aux protéines G sensibles à la toxine pertussique et rôles de ces kinases dans la sécrétion hormonale

Implication des protéines kinases C dans la sécrétion hormonale

Les PKCs sont une famille de sérine/thréonine kinases responsables de la phosphorylation de certains substrats impliqués dans tous les aspects de la physiologie cellulaire. Au niveau des cellules neuroendocriniennes, l'un de ces effets est la co-stimulation, avec le calcium, de la sécrétion hormonale (Knight et Baker, 1983 ; Stojilkovic *et al.*, 1991 ; Zawalich *et al.*, 1991). Par exemple, au niveau de la stimulation de la relâche de l'insuline par le glucose, il a été démontré que le calcium favorise la fusion des granules pré-positionnés, tandis que les PKCs sont nécessaires pour le transport des granules (Zawalich *et al.*, 1991). Au niveau des cellules gonadotropes, les PKCs participeraient dans les deux phases puisqu'elles activent les VOCCs (Stojilkovic *et al.*, 1991). Néanmoins, bien que plusieurs substrats des PKCs, impliqués dans la sécrétion, aient été identifiés dans les cellules neuroendocriniennes, le lien entre leur phosphorylation et la sécrétion n'a pas encore été établi (Liu *et al.*, 1994 ; Shimazaki *et al.*, 1996 ; Rivera et Beaven, 1997 ; Genoud *et al.*, 1999 ; Hilfiker, 1999). À cet égard, les candidats sérieux sont l'actine (Apgar, 1991 ; Walaas, 1999) et la chaîne légère de la myosine (Choi *et al.*, 1994 ; Ludowyke *et al.*, 1996), qui lorsque phosphorylées par les

PKCs se réorganisent de sorte que les granules de sécrétion puissent atteindre la membrane plasmique. L'annexine 2 est également intéressante puisqu'elle est impliquée dans la fusion des granules et représente à la fois un senseur du niveau de calcium intracellulaire et une cible des PKCs (Regnouf *et al.*, 1995 ; Delouche *et al.*, 1997).

Bien que moins étudié, les PKCs peuvent également prendre place au sein des voies de signalisation couplé à la stimulation de la synthèse des hormones peptidiques. Ainsi, elles sont impliquées dans la stimulation de la synthèse de la cholécystokinine par la bombésine (Nemoz-Gaillard *et al.*, 1998), de l'interleukine-1 par les lipopolysaccharides (St-Denis *et al.*, 1998), de la LH par la GnRH (Weck *et al.*, 1998 ; Call et Wolfe, 1999) et de la prolactine par la thyrotropine (Wang et Maurer, 1999). Les PKCs sont également impliquées dans le contrôle de la relâche du CRF, mais ceci, de même que les mécanisme impliqués, sera plus amplement décrit dans la section sur le CRF.

Les sous-familles de protéines kinases C

Les PKCs peuvent être divisées en trois sous-familles selon leur structure et les cofacteurs nécessaires à leur activation (Nishizuka, 1992 ; Mellor et Parker, 1998). Les PKC conventionnelles (α , β I, β II et γ) arborent quatre domaines conservés (C1, C2, C3 et C4) reliés par des domaines spécifiques à chacun des isotypes. Elles nécessitent pour une activité maximale, la présence de calcium, de diacylglycérol (DAG) et de phosphatidylsérine (Nishizuka, 1992). Le domaine C1 contient le site de liaison pour les acides gras insaturés en *cis* et le DAG, le domaine C2 lui confère une liaison au calcium et aux phospholipides acides, le domaine C3 correspond à l'unité catalytique et finalement le domaine C4 contient le site de reconnaissance des substrats (Nishizuka, 1992 ; Shao *et al.*, 1996 ; Mellor et Parker, 1998). Les PKCs nouvelles (δ , ϵ , ϕ et η) ne possèdent pas le domaine C2 classique, elles sont donc insensibles aux fluctuations du niveau de calcium intracellulaire. Les PKCs atypiques (ζ et ι) ne possèdent que la moitié du domaine C1 et pas de domaine C2. Elles sont donc insensibles au calcium et

au diacylglycérol, mais gardent leur sensibilité aux acides gras insaturés en *cis* (Nishizuka, 1992 ; Mellor et Parker, 1998). Finalement, la PKC μ semble faire bande à part puisqu'elle possède un segment transmembranaire et un domaine d'homologie à la pleckstrine, mais aucun domaine C2, (Johannes *et al.*, 1994). À l'exception de cette dernière, les PKCs arborent dans leur portion amino-terminale une séquence autoinhibitrice de type pseudosubstrat, leur conférant une conformation repliée les empêchant d'interagir avec leur substrats (Mellor et Parker, 1998).

Mécanismes globaux d'activation des protéines kinases C

Il est délicat d'uniformiser le mode d'activation des PKCs mais il est évident que certaines étapes sont communes à tous. La plupart des PKCs inactives seraient maintenues à des sites d'ancrage localisés sur divers structures subcellulaires *via* des récepteurs pour les PKCs inactives (RICKs) de façon relativement spécifique à l'isotype (Mochly-Rosen et Gordon, 1998). Les PKCs activées seraient, quant à elles, accueillies à leur site d'action par des récepteurs pour les PKCs activées (RACKs), également de façon spécifique à l'isotype (Mochly-Rosen et Gordon, 1998). Ces sites d'ancrage protéique permettraient ainsi une spécificité de la réponse pour une famille d'enzymes qui démontre une certaine promiscuité vis-à-vis ses substrats.

Un autre trait commun entre les PKCs est une réorganisation intramoléculaire essentielle à leur activation et à leur interaction avec leurs substrats. En effet, l'une des premières étapes de l'activation des PKCs, implique un déploiement occasionné par le bris de l'interaction du pseudosubstrat avec le site catalytique, levant ainsi la suppression intramoléculaire de son activité (House et Kemp, 1987). Les acides gras insaturés en *cis*, tels l'acide arachidonique et l'acide oléique (pour l'ensemble des PKCs), de même que le DAG (pour les PKCs conventionnelles, nouvelles et μ) sont les facteurs occasionnant un tel déploiement (Murakami *et al.*, 1986 ; Koide *et al.*, 1992 ; Ogita *et al.*, 1992 ; Nakanishi *et al.*, 1993 ; Newton, 1995). Toutefois, contrairement à l'activation par le DAG, pourtant plus efficace, l'activation par l'acide arachidonique semble être

indépendante d'une liaison préalable aux phospholipides acides (Murakami *et al.*, 1986), ce qui permettrait à l'acide gras d'induire l'activation des PKCs hors de la membrane. Finalement, hormis les lipides, la phosphorylation de deux (pour la PKC δ et les PKCs atypiques) ou trois résidus (pour les autres PKCs) du domaine C4 est obligatoire pour leur activation (Cazaubon *et al.*, 1994 ; Keranen *et al.*, 1995). Bien qu'il soit reconnu que ces PKCs sont capables, suite à leur activation, d'autophosphorylation sur un (pour la PKC δ et les PKCs atypiques) ou deux (les autres) de ces résidus, il est établi que la phosphorylation, au préalable, d'un résidu thréonine clef, par la kinase dépendante des phosphoinositides de type I (PDK-1) est indispensable (Chou *et al.*, 1998 ; Dutil *et al.*, 1998 ; Garcia-Paramio *et al.*, 1998 ; Le Good *et al.*, 1998).

Mécanismes d'activation des protéines kinases C conventionnelles

L'activation des PLCs représente la principale voie d'activation des PKCs conventionnelles (Fig 4A). Les PLCs parviennent à cette fin en hydrolysant le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate [PtdIns(4,5)P₂], ce qui génère deux seconds messagers, soit le DAG, qui reste dans la membrane et l'inositol 1,4,5-triphosphate [Ins(1,4,5)P₃], un messenger soluble qui entraîne la relâche du calcium intracellulaire (Berridge *et al.*, 1989 ; Dennis *et al.*, 1991 ; Rhee et Choi, 1992). Le calcium, qu'il vienne des réserves intracellulaires ou d'un influx calcique, bien que non-essentiel à la liaison des PKCs conventionnelles à la phosphatidylsérine, augmente de façon significative l'affinité des PKCs pour le phospholipide membranaire (Blobe *et al.*, 1994 ; Newton, 1995 ; Sutton et Sprang, 1998). Cette étape est déterminante pour l'activation de cette sous-famille, puisqu'elle permet à l'enzyme de s'enfoncer dans la membrane de façon à positionner son domaine C1 à proximité du DAG (Newton, 1995 ; Medkova et Cho, 1998). Ce dernier étant responsable, suite au déploiement de l'enzyme, de son activation subséquente par la PDK-1 (Mosior et Newton, 1995). De plus, puisque l'activité de la PDK-1 dépend de la présence du phosphatidylinositol 3,4-biphosphate [PtdIns(3,4)P₂] ou du phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate [PtdIns(3,4,5)P₃], l'activité de la PI3-K devient par ce fait, essentielle pour l'activité des PKCs conventionnelles (Auger *et al.*, 1989 ; Alessi *et al.*, 1997).

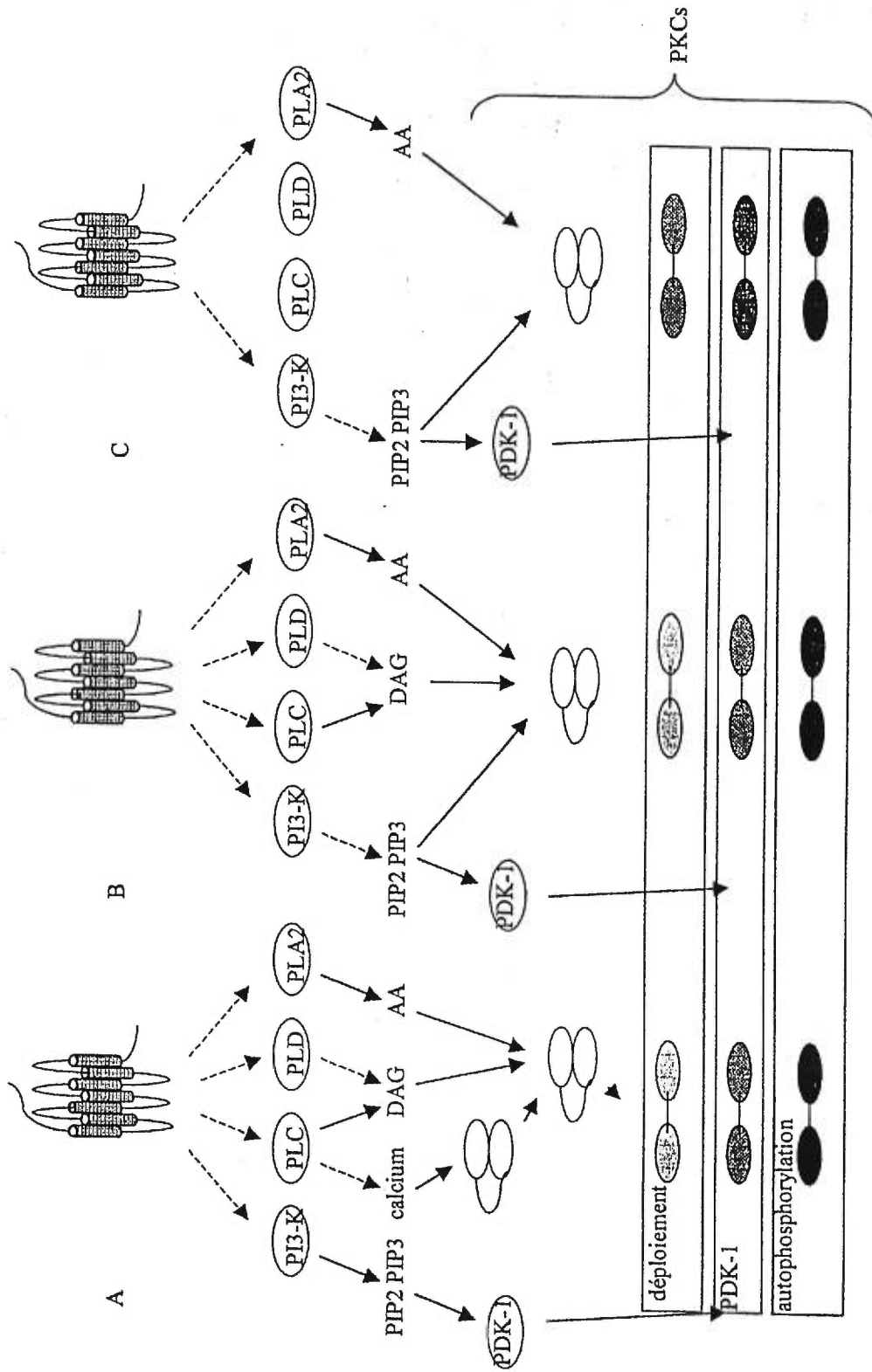


Figure 4. Représentation schématique de l'activation des PKCs. A, conventionnelles; B, nouvelles; C, atypiques. Les abréviations sont les mêmes que dans le texte. La progression de l'activation des kinases se fait du haut vers le bas et les pointillés indiquent que des étapes sont manquantes.

Mécanismes d'activation des protéines kinases C nouvelles

L'activation des PKCs nouvelles, malgré l'existence d'un domaine C2 atypique dans sa portion amino-terminale variable, est indépendante du calcium (Sossin et Schwartz, 1993 ; Pappa *et al.*, 1998) (Fig 4B). Son indépendance face au calcium vient du fait que les résidus basiques de ce domaine, contrairement au domaine C2 conventionnel, sont déjà positionnés de façon à interagir avec les phospholipides acides (Pappa *et al.*, 1998). Ces PKCs sont donc prédisposées à être activées par le DAG et à entrer dans la séquence d'activation. Toutes les PKCs nouvelles peuvent être activées directement par le PtdIns(3,4)P₂ ou le PtdIns(3,4,5)P₃ (Toker *et al.*, 1994). Le mécanisme impliqué dans cette activation n'est pas connu, mais cette activation confère aux PI3-Ks comme aux PLCs, une implication dans l'amorce de l'activation de cette sous-famille de PKCs.

Mécanismes d'activation des protéines kinases C atypiques

Les PKCs atypiques sont insensibles aux fluctuations de la concentration du calcium ou du DAG, mais leur activité dépend de leur interaction avec les phospholipides acides (Nishizuka, 1992 ; Mellor et Parker, 1998) (Fig 4C). Les PKCs atypiques, tout comme les PKCs nouvelles, peuvent être activées directement par les produits de l'activation de la PI3-K (Nakanishi *et al.*, 1993 ; Akimoto *et al.*, 1996). Une petite divergence en ce qui a trait aux PKCs atypiques (de même que pour la PKC δ), la phosphorylation par la PDK-1, n'est plus obligatoire. En effet, au niveau des PKC atypiques, une glutamine (un acide aminé à chaîne latérale acide) remplace un des résidus cibles de l'autophosphorylation, ce qui élimine la nécessité de cette modification post-traductionnelle pour l'obtention d'une activité basale de l'enzyme. Toutefois, la PDK-1 est toujours nécessaire pour l'atteinte d'une activité maximale (Chou *et al.*, 1998 ; Garcia-Paramio *et al.*, 1998 ; Le Good *et al.*, 1998), ce qui fait de la PI3-K la principale voie d'activation de cette sous-famille de PKCs.

Lien entre l'activation des récepteurs couplés aux protéines G sensibles à la toxine pertussique et l'activation des protéines kinases C

La section précédente laisse un vide à combler entre l'activation d'un récepteur couplé à une ou des protéines G sensibles à la PTX et l'aboutissement final, qui est l'activation de la kinase. D'où la nécessité de cette section sur les modes d'activation par ces récepteurs, des PLCs, PI3-Ks, phospholipases D (PLD) et des phospholipase A₂ (PLA₂).

Activation des phospholipases C par les récepteurs couplés aux protéines G sensibles à la toxine pertussique

Les PLCs peuvent, en accord avec leur structure primaire, être classées en trois classes, β , γ et δ (Rhee et Choi, 1992 ; Katan, 1998). Toutefois, seules les PLC- β semblent être régulées de façon directe par les récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques (Rhee et Choi, 1992 ; Katan, 1998). Précisons que les quatre isotypes de PLC- β peuvent être activés par les protéines G de la famille de G_q, notamment *via* leur sous-unité α (Rhee et Choi, 1992 ; Smrcka et Steirnweis, 1993 ; Lee *et al.*, 1994). Toutefois, plusieurs études ont également démontré que les PLC β 1, β 2 et β 3, peuvent être activées par des dimères $\beta\gamma$, mais l'efficacité de cette activation est moindre que celle des sous-unités α des membres de la famille de la protéine G_q (Boyer *et al.*, 1992 ; Camps *et al.*, 1992 ; Katz *et al.*, 1992 ; Smrcka et Steirnweis, 1993). C'est pourquoi les récepteurs qui activent les PLC- β via cette voie alternative, sont généralement couplés aux protéines G sensibles à la PTX, puisque ces dernières sont plus abondantes dans les cellules (Smrcka et Steirnweis, 1993).

Activation des kinases de la position D3 des phosphoinositides par les récepteurs couplés aux protéines G sensibles à la toxine pertussique

Les PI3-Ks sont une grande famille d'enzymes catalysant le transfert du groupe γ -phosphate de l'adénosine triphosphate vers la position D3 des phosphoinositides (Wymann et Pirola, 1998). Une PI3-K activée par le dimère $\beta\gamma$ des protéine G, de même que par les *tyrosine kinases*, a été clonée et désignée p110 γ (Stephen *et al.*, 1994 ; Stoyanov *et al.*, 1995 ; Katada *et al.*, 1999). Cette kinase, à activité mixte (lipides et protéines), est associée à une protéine adaptatrice p101, dont la présence est nécessaire pour que l'action du dimère $\beta\gamma$ soit optimale (Stoyanov *et al.*, 1995 ; Stephens *et al.*, 1997 ; Leopoldt *et al.*, 1998 ; Maier *et al.*, 1999). Intéressamment, l'activation de la p110 γ par le dimère $\beta\gamma$ est en synergie avec son autre mode d'activation, soit la phosphorylation de résidus tyrosines par les *tyrosine kinases* cytosoliques (Katada *et al.*, 1999).

Activation des phospholipases D par les récepteurs couplés aux protéines G sensibles à la toxine pertussique

Les PLCs ne sont pas les seules lipases pouvant générer du diacylglycérol. Les PLDs, qui catalysent l'hydrolyse de la phosphatidylcholine pour produire la choline et l'acide phosphatidique, en sont également des sources indirectes (Divecha et Irvine, 1995 ; Exton, 1998), puisqu'une enzyme ubiquitaire, la phosphomonoestérase, convertit l'acide phosphatidique en DAG (Billah et Anthes, 1990). Les PLDs, en accord avec leur structure primaire, ont été classées en deux types, soit la PLD1, retrouvée au niveau des membranes intracellulaires et dont l'activité est régulable et la PLD2 retrouvée au niveau de la membrane plasmique, dont l'activité est constitutive (Colley *et al.*, 1997 ; Exton, 1998). La PLD1 est activée par le PtdIns(4,5)P₂, le PtdIns(3,4,5)P₃, la petite protéine G monomérique ARF-1 et moindrement par la sous-famille des petites protéines G Rho (Rho A, Rac-1 et Cdc42) (Colley *et al.*, 1997 ; Hammond *et al.*, 1997 ;

Katayama *et al.*, 1998). La PKC α peut également activer la PLD1, mais son action serait indépendante de son activité catalytique (Hammond *et al.*, 1997). Finalement, son activation par les protéines de la sous-famille de Rho, bien que faible, se ferait en synergie avec l'activation par la PKC α et la protéine ARF-1 (Hammond *et al.*, 1997; Katayama *et al.*, 1998).

Trois liens existent entre les récepteurs couplés aux protéines G sensibles à la PTX et la PLD1. Le premier lien est l'activation de la protéine RhoA par les protéines G sensibles à la PTX (Fleming *et al.*, 1996). Le second lien implique l'activation de la PI3-K selon les mécanismes déjà décrits. Le troisième lien est une boucle amplificatrice impliquant l'activation de la PLD1 par la PKC α et la rétroactivation de la kinase suite à la conversion de l'acide phosphatidique en DAG (Nishizuka, 1992).

Activation des phospholipases A₂ cytosoliques par les récepteurs couplés aux protéines G sensibles à la toxine pertussique

Les PLA₂ forment une grande famille de lipases, qui hydrolysent la phosphatidylcholine, pour donner des acides gras, généralement l'acide arachidonique et la lysophosphatidylcholine (Divecha et Irvine, 1995). Le lien entre les récepteurs couplés aux protéines G sensibles à la PTX et un type de ces lipases, les PLA₂ cytosoliques, est connu depuis longtemps (Bokoch et Gilman, 1984; Burch *et al.*, 1986). Toutefois, les voies empruntées pour parvenir à l'activation de ces lipases sont encore nébuleuses. Elles semblent impliquer deux mécanismes, une liaison aux phospholipides membranaires nécessitant une hausse du calcium intracellulaire et une phosphorylation par une *sérine/thréonine kinase* (Burch *et al.*, 1986; Lin *et al.*, 1993 ; Winitz *et al.*, 1994; Xing *et al.*, 1997).

2.1.6.4.2. Voies d'activation des MAP kinases de type ERK_{1/2} par les récepteurs couplés aux protéines G sensibles à la toxine pertussique et rôles de ces kinases dans la sécrétion hormonale

Implication des MAP kinases de type ERK_{1/2} dans la sécrétion hormonale

Les ERK_{1/2} (ERK₁ et ERK₂) font partie d'une famille de *sérine/thréonine kinases*, constituée de trois principales sous-familles, les ERK_{1/2}, les kinases de la portion aminoterminal de c-Jun, aussi appelées kinases activées par le stress cellulaire (JNK/SAPK) et les MAP kinases p38 (Zhou *et al.*, 1995 ; Lewis *et al.*, 1998). Cette famille est, comme les PKCs, impliquée dans plusieurs processus fondamentaux de la physiologie cellulaire. Cependant, les actions des MAP kinases convergent en grande partie vers la phosphorylation et la régulation de facteurs de transcription (Gutkind, 1998). Ainsi, les ERK_{1/2} peuvent influencer la synthèse d'une hormone ou de protéines impliquées dans sa synthèse ou sa relâche. Parmi les exemples connus pour avoir une telle régulation, mentionnons l'insuline par les cellules β (Benes *et al.*, 1999), les cytokines par les lymphocytes (Hedin *et al.*, 1999), de même que la LH et la prolactine par l'hypophyse (Weck *et al.*, 1998 ; Cass et Wolfe, 1999 ; Kanasaki *et al.*, 1999 ; Wang et Maurer, 1999).

Les ERK_{1/2} n'ont pas que des effets génomiques. Au niveau des cellules chromaffines, elles sont impliquées dans la relâche des catécholamines (Cox et Parsons, 1997), au niveau des cellules entéroendocrines, elles sont impliquées dans la relâche de la cholécystokinine (Némoz-Gaillard *et al.*, 1998) et au niveau des trophoblastes, elles entraînent la relâche de la hPL induite par l'apolipoprotéine A-1 (Kanda *et al.*, 1998),

Mécanismes généraux de l'activation des MAP kinases de type ERK_{1/2}

L'activation des ERK_{1/2} est dépendante de la phosphorylation de deux résidus, soit la thréonine-183 et la tyrosine-185 (Payne *et al.*, 1991), tandis que leur inactivation survient suite à l'action de phosphatases spécifiques (Sun *et al.*, 1993 ; Zheng et Guan, 1993). La voie classique pour parvenir à cette double phosphorylation est longue et débute par la phosphorylation d'une tyrosine sur un récepteur ou une protéine adaptatrice telle que Shc ou IRS-1 (Batzer *et al.*, 1994 ; Mayers *et al.*, 1994 ; Pawson, 1994). Par la suite, il se produit une cascade d'interactions moléculaires et de phosphorylations débutant par l'amarrage de la protéine adaptatrice Grb2 (Lowenstein *et al.*, 1992). Ceci permet la translocation à la membrane de la protéine Sos, cette dernière étant un facteur d'échange des nucléotides guanyliques de Ras (Chardin *et al.*, 1993 ; Li *et al.*, 1993 ; Mayers *et al.*, 1994 ; Cobb et Goldsmith, 1995 ; Overbeck *et al.*, 1995). Par la suite, la protéine Ras activée recrute la protéine Raf vers la membrane, ce qui entraîne l'activation de la kinase à activité mixte, soit *serine/threonine* et *tyrosine kinase* (Cobb et Goldsmith, 1995 ; Lewis *et al.*, 1998). Ainsi activée, Raf peut procéder à la phosphorylation et activation des MEK_{1/2} (Cobb et Goldsmith, 1995 ; Lewis *et al.*, 1998). Finalement, les MEK_{1/2}, qui sont également des kinases à activité mixte, activent les ERK_{1/2} en les phosphorylant au niveau de leurs résidus thréonine-183 et tyrosine-185 (Cobb et Goldsmith, 1995 ; Lewis *et al.*, 1998).

Mécanismes d'activation des MAP kinases de type ERK_{1/2} par les récepteurs couplés aux protéines G sensibles à la toxine pertussique

Récemment, les récepteurs couplés aux protéines G sensibles à la PTX ont été associés à l'activation des ERK_{1/2} (Alblas *et al.*, 1993 ; Crespo *et al.*, 1994 ; Hordjijk *et al.*,

1994 ; Koch *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 1995 ; Luttrell *et al.*, 1996 ; Mannon et Raymond, 1998 ; Zukowska-Grojec *et al.*, 1998) (Fig 5). À l'instar de la voie d'activation des ERK_{1/2}, initiée par les récepteurs à activité tyrosine kinase, celle initiée par les protéines G sensibles à la PTX emprunte la cascade Ras-Raf-MEKs (Alblas *et al.*, 1993 ; Winitz *et al.*, 1994 ; Hordjijk *et al.*, 1994 ; Luttrell *et al.*, 1996 ; Della Rocca *et al.*, 1997 ; Lopez-Illasaca *et al.*, 1997), et comme dans la voie classique d'activation, elle est dépendante d'une activité tyrosine kinase en amont de Ras (van Corven *et al.*, 1993 ; Van Biesen *et al.*, 1995 ; Luttrell *et al.*, 1996 ; Wan *et al.*, 1996). Parmi les tyrosines kinases cytosoliques dont l'activité est régulée par les récepteurs couplés aux protéines G sensibles à la PTX, notons la *bruton's tyrosine kinase* (Wan *et al.*, 1997), la Lyn (Ptasznik *et al.*, 1995), la Pyk2 (Lev *et al.*, 1995 ; Dikic *et al.*, 1996), la c-Src (Dikic *et al.*, 1996 ; Luttrell *et al.*, 1996) et la Syk (Wan *et al.*, 1996,1997). De plus, certains récepteurs couplés aux protéines G sensibles à la PTX ont déjà été impliqués dans la transactivation, *via* des tyrosines kinases cytosoliques, de récepteurs à activité tyrosine kinase (Daub *et al.*, 1996 ; Luttrell *et al.*, 1997).

La PI3-K est souvent impliquée dans les mécanismes menant à l'activation des ERK_{1/2} par les récepteurs couplés aux protéines G sensibles à la PTX (Nakamura *et al.*, 1995 ; Pace *et al.*, 1995 ; Hawes *et al.*, 1996 ; Lopez-Illasaca *et al.*, 1997). La PI3-K agirait au tout début de la cascade, puisqu'elle est en amont des *tyrosine kinases* cytosoliques, de Shc, de Sos et de Ras (Lopez-Illasaca *et al.*, 1997). Finalement, les PKCs constituent un autre intermédiaire des voies de signalisation pouvant entraîner l'activation des ERK_{1/2}. Cette implication des PKCs peut être en amont des tyrosines kinases cytosoliques (Lev *et al.*, 1995 ; Blaukat *et al.*, 1999), mais également au niveau d'une phosphorylation directe de Raf-1 (Kolch *et al.*, 1993 ; van Biesen *et al.*, 1996).

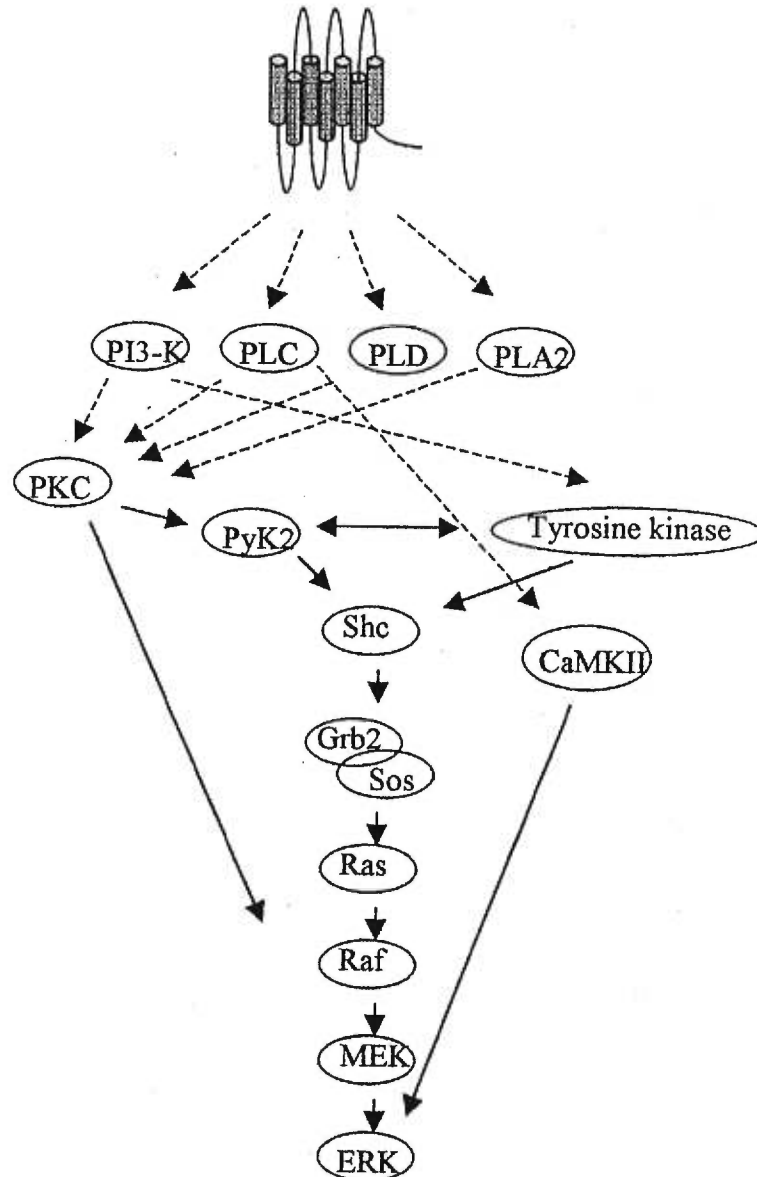


Figure 5. Représentation schématique de l'activation des ERK_{1/2} par les récepteurs couplés aux protéines G sensibles à la PTX. Les abréviations sont les mêmes que dans le texte.

2.1.6.4.3. L'activation des kinases dépendantes du complexe calcium-calmoduline de type II par les récepteurs couplés aux protéines G sensibles à la toxine pertussique et les rôles de ces kinases dans la sécrétion hormonale.

Implication des kinases dépendantes du complexe calcium-calmoduline de type II dans la sécrétion hormonale

La CaMKII est une enzyme ubiquitaire dont l'activité est régie par le niveau de calcium intracellulaire (Hanson et Schulman, 1992 ; Braun et Schulman, 1995). Elle est issue d'une famille de kinases dépendantes du calcium et de la calmoduline, incluant la kinase de la chaîne légère de la myosine, la phosphorylase kinase et la CaMKIV (Hanson et Schulman, 1992 ; Braun et Schulman, 1995). On connaît plus de 40 substrats à cette enzyme multimérique (10-12 sous-unités) composée de sous-unités α et β (Braun et Schulman, 1995). Toutefois, l'un des rôles les mieux connus de cette kinase est la régulation de la sécrétion au niveau neuronal et glandulaire (Braun et Schulman, 1995 ; Jones et Persaud, 1998 ; Waters *et al.*, 1998 ; Easom, 1999 ; Matsumoto *et al.*, 1999). En effet, la CaMKII est impliquée dans la relâche de nombreuses hormones, telles les catécholamine par les cellules chromaffines (schweitzer *et al.*, 1995), la cholécystokinine par les cellules entéroendocrines (Prpic *et al.*, 1994), la GnRH par l'hypothalamus (Waters *et al.*, 1998), l'insuline par les cellules β (Wenham *et al.*, 1992 ; Easom, 1999 ; Matsumoto *et al.*, 1999), la parathormone par les cellules parathyroïdiennes (Matovcik *et al.*, 1997) et la prolactine par les cellules mammothrophes (Cui *et al.*, 1996). Les mécanismes impliqués sont encore moins clairs que ceux impliqués pour les PKCs. Toutefois, au niveau des cellules β , la CaMKII se retrouve au niveau des granules de sécrétion (Mohlig *et al.*, 1997 ; Easom, 1999), et elle phosphoryle certaines protéines impliquées dans l'exocytose, telles la protéine associée aux microtubules de type 2 (MAP-2) et la synapsine 1 (Easom, 1999 ; Matsumoto *et al.*, 1999).

Mécanismes généraux d'activation des kinases dépendantes du complexe calcium-calmoduline de type II

L'activation de la CaMKII débute par le déplacement d'un domaine auto-inhibiteur suite à la liaison du complexe calcium-calmoduline (Hanson et Schulman, 1992 ; Braun et Schulman, 1995). Cette désinhibition est immédiatement suivie d'une autophosphorylation de la Thréonine-286, sur la sous-unité α , et de la thréonine-287 sur la sous-unité β (Miller et Kennedy, 1986 ; Thiel et al., 1988). L'effet de ces autophosphorylations est particulièrement intéressant, puisqu'elles bloquent le retour du domaine auto-inhibiteur, par conséquent, elles promeuvent une indépendance de la kinase envers le calcium (Miller et Kennedy, 1986 ; Hanson et Schulman, 1992). De plus, ces autophosphorylations seraient responsables d'une diminution de la vitesse de dissociation de la calmoduline de plus de milles fois (Mayer et al., 1992). Cependant, cette autonomie est généralement de courte durée, puisque la kinase est rapidement déphosphorylée par des phosphatases telles les phosphatases des protéines de type 1 et 2A (Strack *et al.*, 1997) et la phosphatase des CaMK (Kitani *et al.*, 1999). Cette dernière est particulièrement intéressante puisqu'elle est stimulée par la CaMKII (Kameshita *et al.*, 1999).

Mécanismes d'activation des kinases dépendantes du complexe calcium-calmoduline de type II par les récepteurs couplés aux protéines G sensibles à la toxine pertussique

Afin de pourvoir aux besoins en calcium des CaMKII, les cellules ont accès à deux sources; les réserves intracellulaires (principalement le réticulum endoplasmique) et le milieu extracellulaire (Fig 6). Toutefois, puisque le K_M des pompes calciques membranaires (PMCA), responsables d'expulser le calcium à l'extérieur de la cellule est inférieur à celui de la pompe calcique du réticulum (SERCA), responsable de réintégrer le calcium dans les réserves, tôt ou tard, une entrée de calcium est inévitable pour que la relâche puisse se poursuivre (Putney, 1990 ; Tepikin *et al.*, 1992).

Les voies d'entrée du calcium sont nombreuses et incluent les influx modulés par les différences de potentiel, les influx capacitifs, les influx associés à l'activation de récepteurs et le mode inversé de l'échangeur sodium-calcium (voir les références citées dans les sections suivantes). Toutefois, il est difficile de classifier les différents canaux responsables des influx, puisque comme nous le verrons, un type de canal peut faire partie de plus d'une catégorie. Les L-VOCC, par exemple, sont à la fois régulés par le potentiel membranaire et par l'activation de récepteurs, puisqu'ils sont soumis à un contrôle par les protéines kinases A, les PKCs, les PI3-Ks et les tyrosine kinases cytosoliques. Il en est de même pour certains membres de la famille des protéines TRPs (pour *transient receptor potential*), qui sont à la fois responsables d'influx capacitifs et dépendants de l'activation de récepteurs.

Les deux principales voies permettant au calcium de s'échapper des réserves intracellulaires sont les récepteurs de l'Ins(1,4,5)P₃ et les récepteurs de l'ADP ribose cyclique. Il y a trois sous-types de récepteur de l'ADP ribose cyclique, généralement appelés canaux ryanodine. Cependant, comme aucune évidence n'indique qu'ils soient exprimés dans le placenta, ils ne seront pas traités dans cette thèse. De même, le mode inversé de l'échangeur sodium-calcium ne sera pas traité, puisque contrairement au mode normal (celui qui amène la sortie du calcium), aucun agoniste des récepteurs couplés aux protéines G ne semble l'activer.

Mécanismes d'activation des canaux calciques sensibles aux variations du potentiel membranaire par les récepteurs couplés aux protéines G sensibles à la toxine pertussique

Les VOCC peuvent être classés, de façon préliminaire, en deux grandes catégories : les VOCC activés par une dépolarisation faible et ceux activés suite à une forte dépolarisation (De Waard *et al.*, 1996). La première catégorie ne compte qu'un membre, soit le type T qui a un seuil d'activation de -70 mV (De Waard *et al.*, 1996). La

deuxième est constituée des types L, N, P, Q et R, qui ont des seuils d'activation de -40 à -30 mV (De Waard *et al.*, 1996). Les VOCC peuvent également être classés plus finement selon leur conductance unitaire, leur taux d'inactivation, ainsi que leur sensibilité différentielle vis-à-vis de certains agents bloqueurs. Les L-VOCC ont une conductance relativement élevée (11 à 25 pS), s'inactivent très lentement (plus de 500 msec) et sont sensibles aux dihydropyridines (Varadi *et al.*, 1995 ; De Waard *et al.*, 1996). Les N-VOCC ont une conductance à peine moindre que celle des L-VOCC, (10 à 22 pS), peuvent s'inactiver selon deux cinétiques, soit une rapide (50-100 msec) ou une lente (plus de 500 msec) (De Waard *et al.*, 1996) et sont sensibles à la ω -conotoxine-GVIA, une toxine isolée d'un escargot marin (*Comus geographicus*) (Plumer *et al.*, 1989). Les P-VOCC et les Q-VOCC ont une conductance de 9 à 19 pS et sont sensibles à la ω -agatoxine IVA, une toxine issue du venin d'une araignée (*Agelenopsis aperta*) (Mintz *et al.*, 1992). Les R-VOCC ont une conductance de 14 pS et sont relativement difficiles à caractériser à cause de l'absence d'outils pharmacologiques adéquats, tandis que les T-VOCC ont une conductance de 7 à 10 pS et sont sensibles au mibefradil (Greenberg, 1997).

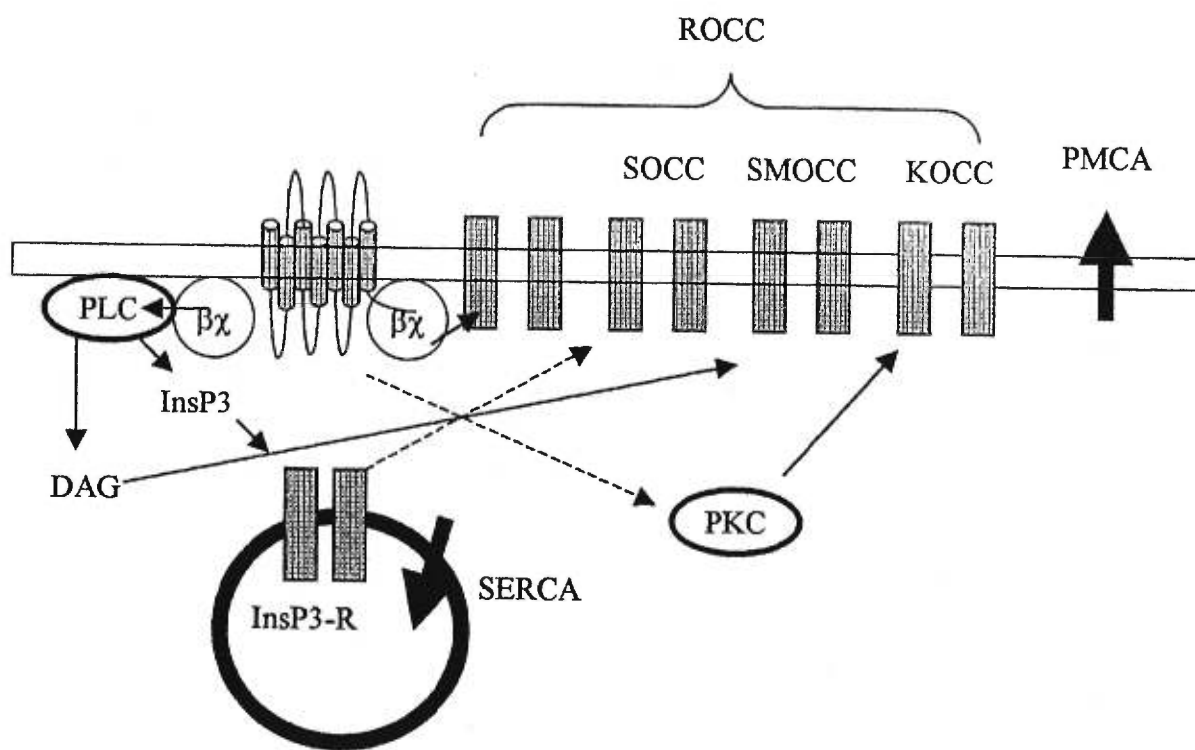
Hormis leur régulation par le potentiel membranaire, plusieurs aspects de la régulation des VOCC permettent une activation par les récepteurs couplés aux protéines G sensibles à la PTX. Les L-VOCC, en particulier, peuvent être activés par ces récepteurs, puisqu'ils sont activés par les PKCs (Yang et Tsien, 1993 ; Schuhmann et Groschner, 1994 ; Obejero-Paz *et al.*, 1998 ; Viard *et al.*, 1999), les PI3-Ks (Viard *et al.*, 1999) ou par certaines *tyrosine kinases* (Hu *et al.*, 1998). Les N-VOCC, P-VOCC et les Q-VOCC, seraient inhibés par les protéines G_i et G_o (De Waard *et al.*, 1997 ; Furukawa *et al.*, 1998). L'inhibition par les protéines G_o est attribuée au dimère $\beta\gamma$, tandis que pour les protéines G_i , les deux sous-unités fonctionnelles (α et $\beta\gamma$) sont impliquées (De Waard *et al.*, 1997 ; Furukawa *et al.*, 1998). Toutefois, une activation préalable des PKCs peut venir contrer cette inhibition du canal (Yang et Tsien, 1993 ; Hamid *et al.*, 1999). De plus, tout comme les L-VOCC, l'activité des N-VOCC, P-VOCC, Q-VOCC et T-VOCC peut être augmentée par une activité tyrosine kinase (Morikawa *et al.*, 1998 ; Potier et

Rovira, 1999). Donc potentiellement, les récepteurs couplés aux protéines G sensibles à la PTX peuvent activer, selon les tissus, toutes les formes de VOCC. Cependant, les L-VOCC sont plus susceptibles d'être activés que les autres. De plus, il est clair que certains VOCC se comportent comme des canaux calciques associés à l'activation des récepteurs (ROCC). Plus précisément, certains d'entre eux se comporte comme des canaux régulés par la production de seconds messagers (SMOCC) et/ou comme des canaux régulés par des activités *sérine/thréonine* ou *tyrosine kinases* (KOCC).

Mécanismes d'activation des influx capacitifs par les récepteurs couplés aux protéines G sensibles à la toxine pertussique

Dans la plupart des cellules, une relâche de calcium des réserves intracellulaires est associée à un influx capacitif (CCE) de calcium, servant entre autre, à remplir les réserves déchargées (Putney, 1986,1990). Ce phénomène, qui peut être déclenché par les récepteurs couplés aux protéines G sensibles à la PTX, est redevable à l'activité de canaux, que l'on retrouve dans la littérature sous les appellations de canaux calciques activés par la relâche du calcium (CRAC). Ces canaux sont gouvernés par des seconds messagers (SMOCC), par les réserves intracellulaires (SOCC) ou par des récepteurs (ROCC) (Hoth et Penner, 1990 ; Clementi *et al.*, 1992 ; Putney et Bird, 1993 ; Clapham, 1995). Un peu comme pour les VOCC, cette nomenclature est un peu arbitraire puisque plusieurs canaux appartiennent à plusieurs de ces catégories. Récemment, les membres d'une famille de protéines appelée TRP ont été proposés comme étant les médiateurs des CCEs observés dans la plupart des cellules (Zhu et al., 1996). Toutefois, certains membres de cette famille, comme la TRP1 et la TRP3, ne sont pas des SOCC, puisqu'ils sont constitutivement actifs (Philipp et al. 1998 ; Sinkins *et al.*, 1998). De plus, les protéines TRP3 et TRP6 sont très peu influencées par le niveau des réserves intracellulaires de calcium (Boulay et al. 1997; Zitt et al. 1997). Toutefois, elles pourraient être classifiées comme des ROCC, puisqu'elles sont, comme la TRP-L,

activées directement par des récepteurs couplés à des protéines de la famille de la G_q (Obukhov *et al.*, 1996 ; Boulay *et al.* 1997; Hurst *et al.* 1998). La TRP3 et la TRP6 pourraient même être classifiées comme des SMOCC, puisque leur activation, *via* ces récepteurs, nécessite l'activation de la phospholipase C et que le diacylglycérol les activent directement (Zhu *et al.*, 1998 ; Hoffman *et al.*, 1999). En fait, seules les protéines TRP4 et TRP5 se comportent comme des SOCC, puisqu'elles sont activées par la relâche du calcium intracellulaire et qu'elles démontrent une perméabilité sélective envers le calcium, ce que les quatre autres protéines préalablement citées n'ont pas (Philipp *et al.*, 1998 ; Warnat *et al.*, 1999). Cependant, le fait que ces protéines se comportent comme des SOCC, ramène la vieille problématique irrésolue concernant la nature du message entre les réserves et ces canaux. À ce sujet, un facteur de faible poids moléculaire a été partiellement purifié par deux équipes (Randriampita et Tsien, 1993 ; Thomas et Hanley, 1995), toutefois, sa nature n'a pu être précisée par la suite. Ainsi, l'activation des PLCs par les récepteurs couplés aux protéines G sensibles à la PTX peut entraîner l'activation des TRP4 et TRP5 (influx capacitif), de même qu'elle peut entraîner une augmentation de la conductance des canaux cationiques non-sélectifs TRP3 et TRP6 (des ROCC). De plus, deux études démontrent l'implication des PKCs dans la prolongation du courant capacitif (Petersen et Berridge, 1994,1995), tandis qu'une autre montre l'implication de l'acide arachidonique, sans toutefois investiguer si cet effet est attribuable à l'activation des PKCs (Shuttleworth et Thompson, 1998). Ce qui semble se dégager de cette complexité au niveau de la régulation du courant capacitif, est qu'il est constitué d'une somme de courant, dont certains sont régulés au niveau des seconds messagers alors que d'autres le sont suite à la libération du calcium des réserves intracellulaires. Néanmoins, l'aboutissement final est le même, le calcium entré permettra de soutenir une relâche ultérieure de calcium.





Voie d'entrée  et de sortie  du calcium

Figure 6. Représentation schématique des voies d'activation des CaMKII par les récepteurs couplés aux protéines G sensibles à la PTX. Les abréviations sont les mêmes que dans le texte.

Mécanismes d'activation des récepteurs de l'inositol 1,4,5-triphosphate par les récepteurs couplés aux protéines G sensibles à la toxine pertussique

Les récepteurs de l'Ins(1,4,5)P₃ sont des homotétramères ou des hétérotétramères formés à partir des trois sous-types de protéines, constituant une famille de récepteurs-canaux conduisant le calcium (Monkawa *et al.*, 1995). Ces récepteurs-canaux, souvent co-exprimés dans les cellules (Wojcikiewicz, 1995), sont distribués en petit amas hétérogènes sur la surface du réticulum endoplasmique (Berridge, 1993 ; Pozzan *et al.*, 1994 ; Thomas *et al.*, 1996). Leur mode de fonctionnement est très similaire à celui des récepteurs de l'ADP ribose cyclique, c'est-à-dire qu'ils sont activés par une hausse de calcium cytosolique. Généralement, la relation entre la concentration cytosolique en calcium et l'activité de ces canaux est biphasique, c'est-à-dire que le calcium augmente leur activité jusqu'à l'atteinte d'une concentration cytosolique d'environ 250-300 nM, puis la diminue graduellement (Bezprozvanny *et al.*, 1991). Cependant, il n'y a pas que la concentration de calcium cytosolique qui soit déterminante pour l'activité canal des récepteurs de l'Ins(1,4,5)P₃, le niveau de remplissage des réserves l'est tout autant. En effet, un certain niveau doit être atteint pour que des efflux spontanés puissent survenir, de même qu'il y aurait un niveau minimal, sous lequel aucune activation n'est possible (Missiaien *et al.*, 1992 ; Combettes *et al.*, 1996). Ces ouvertures spontanées permettent aux ions de sortir jusqu'à ce que la concentration autour de la bouche du canal atteigne une concentration l'inactivant. Cette inactivation du canal, fait en sorte que la petite bouffé de calcium se dissipe et contribue au niveau basal de calcium cytosolique, mais que cette concentration n'atteigne pas un niveau suffisant autour des récepteurs de l'Ins(1,4,5)P₃ pour générer de vague (Allbritton et Meyer, 1993 ; Bootman et Berridge, 1996).

La liaison de l'Ins(1,4,5)P₃ à son récepteur, entraîne une augmentation importante de son affinité pour le calcium (Lechleiter et Clapham, 1992), ce qui fait de lui un co-agoniste, voir même un modulateur allostérique. Ainsi, l'efflux du calcium des réserves intracellulaires peut commencer sans augmentation importante, au préalable, de la concentration cytosolique de calcium. Ainsi, dans les cellules non-excitables, une

concentration faible (bas de la fenêtre physiologique) d'un agoniste interagissant avec un type de récepteur couplé à l'activation des PLCs, entraîne une oscillation de la concentration de calcium cytosolique (Berridge, 1997 ; Shuttleworth, 1997). Au tout début de la stimulation, le peu d'Ins(1,4,5)P₃ généré se fixe sur des sous-groupes de récepteurs-canaux particulièrement réceptifs (Lechleiter et Clapham, 1992 ; Thorn *et al.*, 1993 ; Nathanson, 1994). Par la suite, l'ouverture spontanée de certains récepteurs de leur entourage, leur permet d'être activés (Lechleiter et Clapham, 1992 ; Bootman *et al.*, 1997). Ceci se traduit par l'apparition de nuages de calcium, plus importants, mais toujours localisés, représentant la somme des bouffées d'un amas de récepteurs-canaux (Berridge, 1997 ; Bootman *et al.*, 1997). Ce n'est que lorsque la concentration d'Ins(1,4,5)P₃ est suffisante pour que tous les récepteurs soient occupés, qu'une vague pourra se développer (Parker *et al.*, 1996). Cette vague ne veut pas dire que la cellule sera envahie de calcium, puisque la présence de molécules tampons relativement immobiles dans le cytoplasme réduit énormément la diffusion de l'ion et rend nécessaire le positionnement des réserves aux endroits stratégiques (Allbritton et Meyer, 1993 ; Thomas *et al.*, 1996). Ces vagues, attribuables aux variations de l'activité des récepteurs de l'Ins(1,4,5)P₃, peuvent être principalement de deux types, le type sinusoïdal, moins fréquent, et le type *baseline*, beaucoup plus courant (Putney et Bird, 1993 ; Thomas *et al.*, 1996). Le type sinusoïdal, dont l'amplitude et non la fréquence dépend de la concentration de l'agoniste, est principalement engendré par un feedback exercé par les PKCs au niveau des récepteurs, des protéines G ou des PLCs (Putney et Bird, 1993 ; Thomas *et al.*, 1996). Le type *baseline*, dont la fréquence et non l'amplitude dépend de la concentration de l'agoniste, semble, dans beaucoup de cellules, être dépendant du niveau de calcium intracellulaire basal et de l'influx de calcium (Zhang *et al.*, 1992 ; Girard et Clapham, 1993). Toutefois, dans certains cas, la fréquence des oscillations est telle, que pour l'observer, les niveaux de calcium doivent être mesurés sur de petites surfaces cellulaires (Thomas *et al.*, 1996). Il y a presque autant de modèles, tous plus compliqués les uns que les autres, pour tenter d'expliquer ce type d'oscillations (Thomas *et al.*, 1996 ; Shuttleworth, 1997). Toutefois, la relation en forme de cloche qui existe entre la concentration cytosolique de calcium et l'activité du canal (Bezprozvanny *et al.*, 1991 ; Iino et Endo, 1992), de même que l'activation rapide, suivie d'une inactivation

lente du canal par l'Ins(1,4,5)P₃ (Hajnoczky et Thomas, 1994 ; Marchant et Taylor, 1998) peuvent, à elles seules, expliquer ces oscillations. Par contre, les mécanismes exacts sous-jacents à ces effets des deux ligands des récepteurs de l'Ins(1,4,5)P₃ sont mal connus. Certains auteurs ont décrit la promotion, par de faibles concentrations de calcium, d'un changement de conformation augmentant l'affinité du récepteur pour l'Ins(1,4,5)P₃, tandis que de fortes concentrations inhiberaient la conduction du canal (Marshall et Taylor, 1994). Tandis qu'une autre équipe a proposé un cycle de phosphorylation et de déphosphorylation du récepteur par la CaMKII et la phosphatase 2B, respectivement (Zhang et al., 1993).

2.2. Le facteur de relâche de la corticostimuline

Un quart de siècle d'une recherche dédiée à la découverte d'un facteur de relâche hypothalamique spécifique pour la corticostimuline (ACTH) (Saffran et Schally, 1977), s'est terminé quand l'équipe de Wylie Vale a purifié et déterminé la séquence en acides aminés d'un peptide extrait de l'hypothalamus de mouton (Spiess *et al.*, 1981 ; Vale *et al.*, 1981). Ce peptide de 41 acides aminés semble en effet, répondre aux critères attendus puisqu'il est produit par l'hypothalamus et qu'il est capable de stimuler la relâche de l'ACTH et de la β -endorphine de l'hypophyse ovine (Spiess *et al.*, 1981 ; Vale *et al.*, 1981). Le clonage du gène est venu peu de temps après, chez le mouton (Furutani *et al.*, 1983), puis chez de nombreux mammifères dont l'humain (Shibahara *et al.*, 1983). Le CRF forme avec l'urocortine (Vaughan *et al.*, 1995 ; Donaldson *et al.*, 1996) et un peptide encore non identifié (Weninger *et al.*, 1999), une famille de peptides qui partagent les mêmes récepteurs. Ces peptides ont également un lien de parenté avec la sauvagine, un peptide provenant de la peau d'une grenouille, *Phyllomedusa sauvagei*, et l'urotensine I, un peptide du poisson téléostéen, *Catostomus commersoni* (MacCannell *et al.*, 1982). L'analyse de la structure du CRF ovin et de la sauvagine en solution aqueuse, par dichroïsme circulaire, montre une structure hélicoïdale plutôt désorganisée qui a une forte tendance à former une hélice α hautement amphiphile à

forte concentration ou près d'une membrane (Lau *et al.*, 1983). Dans un mélange trifluoroéthanol/H₂O (2 :1), le CRF humain, qui arbore sept substitutions par rapport au CRF ovin, est constitué d'une hélice α (résidus 6-36) dont la première moitié (résidus 6-36) est clairement amphiphile, entourée par une portion amino-terminale droite et une portion carboxy-terminale désordonnée (Romier *et al.*, 1993).

Trois sous-types de récepteurs du CRF appartenant à la superfamille des récepteurs liés aux protéines G hétérotrimériques ont été clonés. Le sous-type CRF-R1, de même qu'une forme produite par épissage alternatif ayant une insertion de 29 acides aminés dans la première boucle intracellulaire, ont été clonés à partir d'une tumeur hypophysaire humaine (Chen *et al.*, 1993). Le récepteur a également été cloné simultanément à partir d'une lignée cellulaire hypophysaire murine (Vita *et al.*, 1993), d'une banque de cDNA de cerveaux humains (Vita *et al.*, 1993) et de cerveaux de rats (Perrin *et al.*, 1993). Le sous-type CRF-R2 α a été cloné à partir de cDNA de cerveaux de rats (Lovenberg *et al.*, 1995) et d'humains (Liaw *et al.*, 1996), tandis que le sous-type CRF-R2 β a été cloné à partir de cœurs de souris (Perrin *et al.*, 1995 ; Stenzel *et al.*, 1995).

Le CRF, la sauvagine, l'urocortine et l'urotensine I *via* leur liaison à ces récepteurs spécifiques activent l'adénylyl cyclase (Chen *et al.*, 1993 ; Perrin *et al.*, 1993 ; Vita *et al.*, 1993 ; Lovenberg *et al.*, 1995 ; Perrin *et al.*, 1995 ; Stenzel *et al.*, 1995 ; Liaw *et al.*, 1996). Toutefois, contrairement au sous-type CRF-R1, les types CRF-R2 ont une faible affinité pour le CRF. Ce qui permet de croire que chez les mammifères, le ligand physiologique des CRF-R2 est l'urocortine.

2.2.1. Distribution et rôles principaux du CRF

Le CRF est abondant dans le système nerveux central, notamment dans les neurones parvicellulaires du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus et 'olivary' du tronc

cérébral (Matthews *et al.*, 1991 ; Sawchenko *et al.*, 1993). Les neurones du noyau paraventriculaire sont la cible de nombreuses afférences sensorielles et sont la principale source de CRF dans la circulation portale hypophysaire de même que dans le *locus ceruleus*, d'où le rôle important du peptide régulateur de la fonction hypophyso-surrénalienne et la réponse au stress (Chrousos, 1992 ; Sawchenko *et al.*, 1993). En périphérie, l'ARN messager du préproCRF est synthétisé chez l'humain par les kératinocytes et les mélanocytes de la peau (Slominski *et al.*, 1995), les surrénales (Usui *et al.*, 1988) et le syncytiotrophoblaste du placenta (Grino *et al.*, 1988 ; Usui *et al.*, 1988). Toujours chez l'humain, le peptide a également été localisée dans le côlon, le duodénum, l'estomac, le foie, le pancréas et les poumons (Suda *et al.*, 1984 ; Kawahito *et al.*, 1994).

En ce qui à trait aux tissus reproducteurs femelles, des études chez le rat et l'humain ont démontré la présence de l'ARN messager du préproCRF dans les cellules épithéliales glandulaires de l'endomètre utérin durant la phase de prolifération et de sécrétion du cycle menstruel (Petraglia *et al.*, 1992 ; Makrigiannakis *et al.*, 1995a,b ; Mastorakos *et al.*, 1996). Le CRF se retrouve aussi dans les ovaires du rat, notamment dans les cellules du stroma, de la thèque et du corpus luteum (Mastorakos *et al.*, 1993). Puisque ces cellules ovariennes possèdent également des sites de liaison pour l'hormone (Mastorakos *et al.*, 1993), cela suggère un rôle pour le CRF dans la régulation autocrine et paracrine de la fonction ovarienne.

2.2.2. Origine de la hausse de la concentration plasmatique du CRF durant la grossesse

Chez l'humain, la concentration plasmatique ou portale hypothalamique de CRF est très faible (Suda *et al.*, 1985a ; Sasaki *et al.*, 1987a). Toutefois, pendant la grossesse, la concentration du peptide au niveau du plasma maternel, du plasma foetal et du liquide amniotique augmente de façon exponentielle de la mi-grossesse jusqu'au travail (Sasaki *et al.*, 1984, 1987a,b ; Goland *et al.*, 1986, 1988 ; Campbell *et al.*, 1987 ; Economides *et*

al., 1987 ; Laatikainen *et al.*, 1987b ; Wolfe *et al.*, 1988a ; Jeske *et al.*, 1989 ; Petraglia *et al.*, 1990c). De plus, contrairement au cas de césarienne, lors d'accouchements spontanés, qu'ils soient à terme ou non, une hausse additionnelle des concentrations amniotique et plasmatique de CRF est mesurée (Goland *et al.*, 1986 ; Sasaki *et al.*, 1987b ; Petraglia *et al.*, 1990c).

Bien que cela puisse n'être que pure coïncidence, un niveau élevé de CRF dans le plasma fœtal et maternel a été rapporté dans plusieurs études portant sur des naissances prématurées, de même qu'en présence de pathologies associées à des naissances prématurées, tel l'hypertension de grossesse (Jeske *et al.*, 1991), une infection (Petraglia *et al.*, 1995), la pré-éclampsie (Wolfe *et al.*, 1988b ; Laatikainen *et al.*, 1991 ; Warren *et al.*, 1992 ; Goland *et al.*, 1995) et le travail prématuré (Tropper *et al.*, 1992 ; McLean *et al.*, 1995 ; Petraglia *et al.*, 1995 ; Bisits *et al.*, 1998).

Plusieurs facteurs plaident en faveur d'une origine utéro-placentaire pour le CRF circulant. Ce peptide ne passe pas la barrière hémato-encéphalique (Chrousos *et al.*, 1985). Le CRF est produit en grande quantité dans le placenta (Shibasaki *et al.*, 1982 ; Sijonmaa *et al.*, 1988 ; Thomson *et al.*, 1988). La concentration en CRF est plus élevée dans le plasma des veines que de l'artère ombélicales (Goland *et al.*, 1986,1988 ; Sasaki *et al.*, 1987b). Des études ont également démontré que l'ARN messager du CRF est exprimé dans le placenta (Grino *et al.*, 1987 ; Usui *et al.*, 1988) et qu'à l'instar de la concentration plasmatique du peptide, son expression augmente de façon exponentielle jusqu'à la fin de la grossesse (Frim *et al.*, 1988). Des études immunohistochimiques démontrent que les membranes annexes, de même que la caduque, sont immunoréactives au CRF (Saijonmaa *et al.*, 1988 ; Riley et Challis, 1991 ; Perkins et Linton, 1995 ; Warren et Silverman, 1995). De plus, dans le placenta, bien que de façon plus modeste, la quantité de transcrits du préproCRF dans les cellules épithéliales glandulaires, du stroma de l'endomètre utérin et de la caduque augmente de façon exponentielle à partir du deuxième trimestre de la grossesse (Petraglia *et al.*, 1992 ; Makrigiannakis *et al.*, 1995a,b ; Mastorakos *et al.*, 1996). Finalement, le CRF disparaît de la circulation

maternelle rapidement après l'accouchement (Goland *et al.*, 1986 ; Laatikainen *et al.*, 1987b).

En ce qui concerne la localisation cellulaire exacte du CRF placentaire, les études immunohistochimiques ne sont pas unanimes. Les premières études démontrent une localisation dans les cytotrophoblastes exclusivement (Petraglia *et al.*, 1987b ; Saijonmaa *et al.*, 1988), d'autres plus récentes révèlent une localisation exclusive dans le syncytiotrophoblaste (Riley *et al.*, 1991 ; Perkins et Linton, 1995), tandis qu'une autre présente une localisation mixte (Warren et Silverman, 1995). Toutefois, les résultats obtenus *in vitro* favorisent le syncytiotrophoblaste puisque la relâche du CRF est négligeable lors de l'isolation des cytotrophoblastes et devient maximale 3-5 jours après l'isolation (Petraglia *et al.*, 1989a ; Ni *et al.*, 1997). Une période suffisante pour que les cytotrophoblastes forment un syncytiotrophoblaste fonctionnel (Kliman *et al.*, 1986 ; Sooranna et Contractor, 1990).

2.2.3. Régulation de l'expression et de la relâche du CRF

Il est reconnu que la relâche du CRF par les cellules trophoblastiques *in vitro* est hautement régulée (Petraglia *et al.*, 1987b, 1989a, 1990b ; Robinson *et al.*, 1988 ; Jones *et al.*, 1989 ; Riley et Challis, 1991 ; Karalis *et al.*, 1996). Parmi la panoplie de régulateurs connus, la progestérone est reconnue comme le principal inhibiteur de la synthèse du CRF, tandis que les glucocorticoïdes auraient dans le placenta, un effet stimulateur sur la synthèse du CRF, contrairement à tous les autres tissus étudiés à ce jour (Robinson *et al.*, 1988 ; Jones *et al.*, 1989 ; Karalis *et al.*, 1996). Cependant, il s'agit d'une interprétation que je crois erronée, puisque des trophoblastes cultivés en absence de sérum ou de cholestérol, donc dans l'impossibilité de produire de la progestérone, ont un niveau basal de relâche du CRF quadruple par rapport à ceux mis en présence de sérum, ce qui permet de mettre en évidence l'action inhibitrice des glucocorticoïdes (Karalis., 1996). Certes, au début de la grossesse, lorsque la concentration de progestérone est faible, l'action inhibitrice des glucocorticoïdes devrait pouvoir être perçue. D'ailleurs,

deux études, portant sur les effets de l'administration de glucocorticoides, montrent qu'avant la 32^e semaine, les glucocorticoides exogènes entraînent une inhibition de la relâche du CRF, alors qu'en fin de grossesse ils entraînent une stimulation (Crane *et al.*, 1993 ; Marinoni *et al.*, 1998).

Le reste des modulateurs de la relâche du CRF placentaire sont très similaires à ceux retrouvés au niveau hypothalamique (Orth, 1992). L'interleukine-1, une cytokine produite par plusieurs cellules placentaires (Paulesu *et al.*, 1991), augmente la relâche du CRF par les cellules trophoblastiques en culture (Petraglia *et al.*, 1990b), comme c'est le cas dans l'hypothalamus (Sapolsky *et al.*, 1987 ; Tsagarakis *et al.*, 1989a). L'acétylcholine, l'angiotensine II, l'ocytocine et l'arginine vasopressine, toutes produites par le tissu placentaire (Sastry *et al.*, 1997), sont comme leur homologue hypothalamique des stimulateurs de la relâche du CRF (Petraglia *et al.*, 1989a,1998 ; Suda *et al.*, 1985b ; Tsagarakis *et al.*, 1988). Le NPY, tel que mentionné dans la section précédente, est un régulateur positif de la relâche du CRF placentaire (Petraglia *et al.*, 1989a,c) comme dans l'hypothalamus (Haas et George, 1987 ; Tsagarakis *et al.*, 1989b ; Suda *et al.*, 1993).

Dans la plupart des cellules, les voies de signalisation associées à une augmentation de la transcription de l'ARN messager du préproCRF ou de la relâche du CRF mature, convergent vers l'élément de réponse de l'adénosine monophosphate présent dans le promoteur du gène du CRF (Seasholtz *et al.*, 1988). Les protéines kinases dépendantes de l'adénosine monophosphate cyclique (PKA) et les PKCs ont toutes deux été impliquées dans le contrôle de la synthèse et de la relâche du CRF (Suda *et al.*, 1985b ; Adler *et al.*, 1990 ; Emanuel *et al.*, 1990 ; Hu *et al.*, 1992a,b,c ; Parkes *et al.*, 1993 ; Van, 1993 ; Itoi *et al.*, 1996 ; Kasckow *et al.*, 1997). Les PKAs utilisent la voie classique débutant par la phosphorylation de la protéine liant l'élément de réponse de l'adénosine monophosphate cyclique (CREB) (Seasholtz *et al.*, 1988). Les PKCs utilisent une voie moins directe, puisqu'il n'y a pas d'éléments de réponse qui leur sont associés de façon

classique dans le promoteur du CRF. Il a été proposé que les voies empruntées par les PKCs impliqueraient la transcription des proto-oncogènes *c-jun* et *c-fos* (Morgan et Curran, 1991), qui à leur tour, transactiveraient l'élément de réponse CRE du promoteur du CRF (Van, 1993 ; Gill *et al.*, 1998). L'activation des PKCs peut également augmenter la synthèse du CRF *via* une poly-adénylation (Adler *et al.*, 1992), ce qui en général, augmente la stabilité de l'ARN messager.

Dans l'hypothalamus (Tsagarakis *et al.*, 1991) et les neuroblastomes (Sherrif *et al.*, 1998), une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire est couplée à une relâche accrue du CRF. Plus précisément, une étude effectuée *in vivo* chez le rat a ciblé les L-VOCC comme étant médiateur de la stimulation de la relâche du CRF, suite à une dépolarisation dans l'éminence médiane (Gabr *et al.*, 1994).

Au niveau du syncytiotrophoblaste, seul le rôle de l'axe synthase du monoxyde d'azote-protéine kinase G a clairement été démontré pour être négativement impliqué dans la relâche du CRF (Roe *et al.*, 1994 ; Ni *et al.*, 1997). Certaines études montrent également l'implication d'une voie régulant la relâche du CRF qui serait dépendante du potentiel membranaire (Thomson *et al.*, 1988 ; Sun *et al.*, 1994 ; Ni *et al.*, 1997). Ces études ont démontré qu'une dépolarisation induite par de fortes concentrations de KCl entraîne la relâche du peptide, sans toutefois en modifier sa synthèse. Ce qui est un peu surprenant puisque le syncytiotrophoblaste ne possède que de petites réserves de CRF (Smith, 1998a). Finalement, une étude effectuée sur des cellules de carcinomes chorioniques, transfectées avec le promoteur du gène du CRF, a révélé que le récepteur de la prostaglandine E₂ augmente l'expression du peptide *via* l'activation de l'adénylyl cyclase et l'activation subséquente de la PKA (Dibbs *et al.*, 1997).

2.2.4. Rôles du CRF durant la grossesse.

2.2.4.1. Rôles progestatifs du CRF

Parmi les rôles attribués au CRF, celui de peptide progestatif semble l'un des mieux soutenu par la littérature. Le tout débute avant même l'implantation, *via* la sécrétion par le blastocyte de facteurs favorisant la relâche par l'endomètre du CRF, tels la prostaglandine E₂, mais surtout l'interleukine-1 (Simon *et al.*, 1992). En effet, l'interleukine-1 est reconnue, du moins au niveau de l'hypothalamus et du placenta, pour induire la sécrétion du CRF (Sapolsky *et al.*, 1987 ; Petraglia *et al.*, 1990b) et s'avère indispensable, du moins chez la souris, au succès de l'implantation (Simon *et al.*, 1992). Chez l'humain, lors de la fertilisation *in vitro*, la présence de la cytokine en grande concentration dans le milieu de culture, est un indicateur du succès de l'implantation futur (Sheth *et al.*, 1991). Les cellules de l'endomètre humain expriment également le gène de la pro-opio-mélano-cortine ainsi que ses peptides finaux (Makrigiannakis *et al.*, 1992). Il n'est donc pas impossible que l'un des rôles du CRF soit de réguler de manière autocrinienne ou paracrinienne la sécrétion de la corticostimuline ou de la β -endorphine. Il a également été rapporté que le CRF favorise la relâche de la progestine par les cellules de l'endomètre en culture (Ferrari *et al.*, 1995), suggérant ainsi un rôle pour le CRF dans la différenciation de l'endomètre en caduque. Ainsi, l'embryon en favorisant la production de CRF au site d'implantation, participerait aux modifications locales essentielles au maintien de la grossesse.

2.2.4.2. Influence du CRF sur l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien

En temps normal, l'axe HHS occupe une place déterminante dans l'homéostasie, en particulier lors de stress importants, puisque ses médiateurs finaux, les glucocorticoïdes sont impliqués dans plusieurs aspects du contrôle du métabolisme (Widmaier, 1992). Le

CRF produit par le placenta est sécrété de part et d'autre du syncytiotrophoblaste. Il en résulte donc, que le peptide se retrouve dans les compartiments maternel et fœtal (Majzoub et Karalis, 1999). Il peut ainsi stimuler les axes HHS de la mère et du fœtus, particulièrement en fin de grossesse (Pepe et Albrecht, 1990 ; Goland et al., 1994).

2.2.4.2.1. L'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien maternel

La grossesse est accompagnée d'une hypercortisolémie, où les fractions libres et liées du stéroïde sont élevées (Fencl et al., 1980 ; Carr *et al.*, 1981 ; Nolten et Ruckert, 1981 ; Goland et al., 1994). Toutefois, malgré l'influence du CRF placentaire, le rythme circadien du cortisol plasmatique est maintenu (Nolten et Ruckert, 1981), démontrant ainsi que l'hypothalamus maternel reste un déterminant important de la cortisolémie maternelle. De plus, malgré la concentration élevée de cortisol fœtal et maternel, ni le fœtus, ni la mère ne semblent démontrer de symptômes Cushingoïdes, ce phénomène pourrait être attribuable à un métabolisme accru et à un état réfractaire des tissus cibles (Waddell, 1993).

Il est important de souligner qu'il y a un certain déséquilibre entre les concentrations de CRF, d'ACTH et de cortisol. En effet, bien que l'expression placentaire et la concentration plasmatique de CRF augmentent exponentiellement durant la grossesse (Sasaki *et al.*, 1984, 1987a ; Goland *et al.*, 1986, 1988 ; Campbell *et al.*, 1987 ; Laatikainen *et al.*, 1987b ; Jeske *et al.*, 1989), la hausse de la concentration d'ACTH plasmatique est beaucoup plus modeste (Raisenen, 1988 ; Jeske *et al.*, 1989). Une équipe impute cet état de fait à une réponse amoindrie de l'hypophyse de la femme enceinte (Schulte *et al.*, 1990), tandis que d'autres démontrent que l'administration de CRF à des femmes enceintes de 38-40 semaines résulte en une réponse normale de l'axe hypophysio-surrénalien (Sasaki *et al.*, 1989 ; Suda *et al.*, 1993). Il a été proposé, que cet effet mitigé du CRF dépend de la présence dans le plasma maternel et fœtal de protéines liant le CRF (CRF-BP) (Nishimura *et al.*, 1987 ; Orth et Mount, 1987 ; Suda *et al.*, 1988 ; Perkins *et al.*, 1995). Toutefois, la concentration de ces protéines chute de 60 %

durant les quatre dernières semaines de grossesse, ce qui devrait entraîner une hausse de la fraction libre de CRF, donc de son activité (Linton *et al.*, 1993 ; Perkins *et al.*, 1993). Certains ont proposé qu'il y ait une rétroaction négative de l'hypophyse par les glucocorticoïdes ou encore une désensibilisation des récepteurs du CRF (Schulte *et al.*, 1990 ; Goland *et al.*, 1991). Malgré ces faits, plusieurs études ont démontré une association significative, bien que modeste, entre la concentration plasmatique de CRF et d'ACTH, de β -endorphine ou de cortisol pendant la grossesse (Okamoto *et al.*, 1989 ; Sasaki *et al.*, 1989 ; Smith *et al.*, 1990 ; Goland *et al.*, 1992 ; Chan *et al.*, 1993 ; Magiakou *et al.*, 1996 ; Wadhwa *et al.*, 1997).

2.2.4.2.1. L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien fœtal

L'axe HHS fœtal est fonctionnel dès la 12^e semaine de grossesse (Blumenfeld et Jaffe, 1986 ; Waddell, 1993). C'est-à-dire que l'hypothalamus contient du CRF, l'hypophyse de l'ACTH et que sous l'action de CRF exogène, l'hypophyse relâche de l'ACTH. Durant la grossesse, les surrénales fœtales, particulièrement la portion interne de leur cortex (appelée zone fœtale) sont très actives (Pepe et Albrecht, 1990). Bien que les surrénales fœtales aient le potentiel de produire du cortisol à partir de la progestérone placentaire (Voutilainen et Miller, 1986), les principaux stéroïdes produits sont la déhydroépiandrotérone (DHEA) et sa forme sulfatée (DHEAS) (Pepe et Albrecht, 1990). En fait, il semble bien établi que malgré l'activité 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase placentaire (Lopez-Bernal et Craft, 1981 ; Burton et Waddell, 1999), la majorité du cortisol fœtal provient de la mère jusqu'à la mi-grossesse (Pepe et Albrecht, 1990). Ce n'est seulement que vers la fin de la grossesse, alors que les concentrations de CRF et d'ACTH sont au zénith, et que le cortisol maternel est à son plus bas, que les surrénales fœtales voient leur activité 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase-isomérase augmentée, et par le fait même, leur production de cortisol (Parker *et al.*, 1995 ; Brooks *et al.*, 1996 ; Mesiano et Jaffe, 1997). Il serait d'ailleurs intéressant de comprendre pourquoi, le

cortisol ne freine pas l'axe hypothalamo-hypophysaire fœtal en fin de grossesse, alors qu'en début de grossesse, le cortisol maternel y parvient.

Pour ce qui est de la DHEA et de la DHEAS, leur production augmente progressivement tout au long de la grossesse (Pepe et Albrecht, 1990 ; Mesiano et Jaffe, 1997), tout comme celle de l'ACTH. Ce qui est normal puisque l'ACTH stimule la croissance de la zone fœtale (Jaffe *et al.*, 1998), la dégradation des LDL (Ohashi *et al.*, 1981) et augmente la synthèse des enzymes responsables de la production des stéroïdes (Lebrethon *et al.*, 1994). Toutefois, la corrélation entre les concentrations plasmatiques de DHEA, de DHEAS et de CRF, est encore meilleure. Ceci serait due à une stimulation directe de la stéroïdogénèse surrénalienne fœtale (Majzoub et Karalis, 1999) principalement, la production de DHEAS (Smith *et al.*, 1998b ; Chakravorty *et al.*, 1999) par le CRF. Chez l'humain, le DHEAS est hydroxylé au niveau du foie fœtal, contrastant ainsi avec tous les autres modèles animaux, ainsi chez la femme enceinte, l'œstriol est formée de préférence à l'œstradiol et l'œstrone (Darne *et al.*, 1987).

Bien que le CRF placentaire entraîne la relâche de la β -endorphine et de l'ACTH par les cellules trophoblastiques *in vitro* (Petraglia *et al.*, 1987b; Margioris *et al.*, 1988), un effet qui est partagé par l'urocortine (Petraglia *et al.*, 1999), il ne semble pas que cette ACTH soit celle retrouvée dans les circulations maternelle et fœtale, puisque le placenta n'en produit qu'une faible quantité (Margioris *et al.*, 1988).

2.2.4.3. Implication du CRF dans la maturation fœtale et l'initiation du travail

2.2.4.3.1. Le myomètre utérin quiescent

Le myomètre utérin, influencé par de nombreux facteurs de quiescence, est relativement calme tout au long de la grossesse, tandis que le col de l'utérus est fermé fermement

(Challis *et al.*, 1997 ; Chwalisz et Garfield, 1997). Parmi ces facteurs, on retrouve le monoxyde d'azote (NO), le peptide apparenté à l'hormone parathyroïdienne (PTHrP), la progestérone, la prostacycline et la relaxine (Challis *et al.*, 1997 ; Chwalisz et Garfield, 1997).

Le principal déterminant de l'état de quiescence est, sans contredit, un ratio progestérone/œstriol élevé (Chwalisz et Garfield, 1997). La progestérone jouant ce rôle principalement *via* la suppression de la formation des jonctions communicantes (Garfield *et al.*, 1980) et l'expression des L-VOCC (Tezuka *et al.*, 1995). Trois autres effets non-négligeables de la progestérone sont l'augmentation de l'avidité des réserves intracellulaires de calcium (Carsten, 1979) et l'augmentation de la synthèse de NO (Chwalisz et Garfield, 1997) et l'inhibition de la synthèse des prostaglandines (Wilson *et al.*, 1986). De plus, durant plusieurs années la communauté scientifique a cru à un effet de la progestérone sur l'expression des récepteurs de l'ocytocine (Fuchs *et al.*, 1983), il semblerait toutefois que chez l'humain ce ne soit pas le cas (Swahn et Bygdeman, 1988). Il semble donc que l'action progestative de la progestérone soit en grande partie attribuable à une diminution de l'excitabilité et de la conductivité du myomètre.

Le NO, un autre inhibiteur de l'expression de la connexine-43 (composante principale des jonctions communicantes) est également important pour le maintien de la quiescence du myomètre utérin (Chwalisz et Garfield, 1997 ; Sladek *et al.*, 1999). La relaxine, un peptide produit par le *corpus luteum*, l'endomètre, la caduque et le placenta (Fields et Larkin, 1981 ; Bryant-Greenwood et Schwabe, 1994) y joue aussi un rôle important, puisqu'elle entraîne la déphosphorylation de la chaîne légère de la myosine (Bryant-Greenwood et Schwabe, 1994).

2.2.4.3.2. L'initiation du travail et de l'accouchement

L'initiation du travail se fait en deux phases ; la phase préparatoire qui est longue et progressive dépend principalement de l'action conditionnante de l'œstriol, et la phase

active qui est rapide dépend de l'action accrue des facteurs utérotoniques, tels le CRF, l'ocytocine et les prostaglandines (Challis *et al.*, 1997 ; Chwalisz et Garfield, 1997). Durant la phase préparatoire, deux phénomènes se chevauchent, l'activité du myomètre augmente et le col de l'utérus se ramollit et s'affaisse (Leppert, 1992 ; Nathanielsz *et al.*, 1995). La phase active se caractérise par le passage à une forme de contraction coordonnée dépendant d'une augmentation de l'excitabilité et de la vitesse de propagation de l'influx (Nathanielsz *et al.*, 1995), et d'une dilatation du col de l'utérus (Leppert, 1992). L'un des aspects favorisant l'excitabilité est l'augmentation de l'expression des canaux calciques de type L-VOCC (Tezuka *et al.*, 1995) et des jonctions communicantes (Garfield *et al.*, 1995).

Chez la plupart des animaux, l'initiation du travail se produit suite à une baisse de la concentration plasmatique de progestérone (Csapo, 1977) et à une hausse de l'activité de l'axe HHS foetal (Liggins *et al.*, 1973). Toutefois, chez l'humain il n'y a pas de baisse de la concentration de progestérone, seulement une modification du ratio progestérone/oestrogènes (Tulchinsky *et al.*, 1972 ; Darne *et al.*, 1987). Cette baisse du ratio entraîne une légère augmentation de la production d'ocytocine au niveau hypophysaire et utéro-placentaire, ainsi qu'une augmentation de celle des prostaglandines au niveau utéro-placentaire, les deux principaux utérotoniques physiologiques (Casey, et MacDonald, 1988 ; Hirsh *et al.*, 1993 ; Challis et Lye, 1994 ; Maggi *et al.*, 1994). L'augmentation de la concentration plasmatique d'ocytocine étant modeste, il est peu probable que l'ocytocine en provenance de l'hypophyse maternelle, soit responsable de l'augmentation de l'activité du myomètre (Chard, 1989), toutefois, rien n'exclut l'ocytocine produite localement (Chibbar *et al.*, 1993). Une autre conséquence du faible ratio progestérone/oestrogènes est l'augmentation de la densité des récepteurs pour l'ocytocine (Maggi *et al.*, 1994), ce qui entraîne une augmentation de la sensibilité du myomètre vis-à-vis de l'ocytocine (Fuchs *et al.*, 1982 ; Casey, et MacDonald, 1988 ; Hirsh *et al.*, 1993 ; Challis et Lye, 1994). D'ailleurs, les actions de l'ocytocine sont d'une part, directes puisqu'elle stimule la contraction du myomètre, mais également indirectes puisqu'elle est couplée positivement à la production de prostaglandines et de leukotriènes par la caduque et les membranes fœtales (Fuchs *et al.*,

1981,1982 ; Pasetto *et al.*, 1992 ; Hirsh *et al.*, 1993). En ce qui concerne l'expression de la connexine-43, la littérature a longtemps laissé croire que les œstrogènes étaient responsables de sa régulation à la hausse durant l'initiation du travail en fin de grossesse, mais des études récentes montrent que cette hausse serait indépendante des récepteurs d'œstrogènes et de progestérone (Geimonen *et al.*, 1998) mais dépendante de l'étirement de l'utérus (Ou *et al.*, 1997).

La préparation du col de l'utérus pour le travail et l'accouchement nécessite un réarrangement important de la matrice extracellulaire (Leppert, 1992). Ce réarrangement implique entre autres, une dégradation de la matrice, particulièrement, par les neutrophiles, une augmentation du turnover du collagène et une augmentation du hyaluronane (Leppert, 1992 ; Kelly *et al.*, 1993). Plusieurs régulateurs locaux du mûrissement du col de l'utérus ont été proposés mais l'interleukine-8, le NO et la relaxine seraient les plus plausibles (MacLennan *et al.*, 1980 ; Entenmann, *et al.*, 1988 ; Kelly *et al.*, 1993). La progestérone de par son effet inhibiteur sur la production de cytokines, et par conséquent sur la migration des neutrophiles, est évidemment un régulateur important de la maturation du col de l'utérus (Kelly *et al.*, 1993 ; Chwalisz, 1994).

Bien qu'elle soit utilisée depuis longtemps en clinique pour déclencher le travail, l'ocytocine endogène, qu'elle soit d'origine hypophysaire ou locale, probablement à cause de l'activité ocytocinase plasmatique et utéro-placentaire, n'est pas impliquée dans l'initiation du travail (Burd *et al.*, 1987). Par contre, la sécrétion réflexe de l'ocytocine hypophysaire suite à la distension du col de l'utérus accompagnant les poussées, fait en sorte que l'hormone atteigne, bien que de façon pulsatile, des concentrations suffisantes pour favoriser la progression du travail (Fuchs *et al.*, 1991 ; Thornton *et al.*, 1992).

Le CRF dans l'initiation du travail et de l'accouchement

Le CRF est un autre peptide ayant un rôle majeur sur la terminaison de la grossesse. D'abord, en stimulant l'axe HHS, le CRF favorise la production de cortisol et de sulfate de DHEAS par les surrénales fœtales (Pepe et Albrecht, 1990 ; Muglia *et al.*, 1995) (Fig 7). Le cortisol stimule la maturation du fœtus, notamment ses poumons, en plus d'être impliqué dans une boucle amplificatrice avec le CRF qui a été proposée être le moteur de l'horloge placentaire déterminant la durée de la grossesse (Pepe et Albrecht, 1990 ; Liggins, 1994 ; McLean *et al.*, 1995 ; Muglia *et al.*, 1995 ; Keralis *et al.*, 1996). Le DHEAS et sa forme hydroxylée sont les précurseurs de la synthèse placentaire d'œstradiol et d'œstriol, elles mêmes favorisant la maturation fœtale en plus de préparer le myomètre pour le travail *via* la synthèse de jonctions serrées, de L-VOCC et de prostaglandines (Pepe et Albrecht, 1990 ; McLean *et al.*, 1995). À propos du rôle du DHEAS dans l'installation des conditions favorables au travail, des études montrent qu'une infusion du stéroïde chez la mère (singe rhésus) entraîne une augmentation de la concentration d'œstradiol, une augmentation de l'activité utérine et un accouchement avant terme (Figuerola *et al.*, 1989 ; Mecenas *et al.*, 1996). Chez la femme, les moments de la journée durant lesquels l'œstriol est plus abondante (le soir) coïncident avec ceux où l'activité utérine est maximale (McGregor *et al.*, 1997).

Plus directement, le CRF stimule la relâche de l'ocytocine et des prostaglandines par l'amnios, la caduque et le placenta (Jones et Challis, 1989,1991 ; Florio *et al.*, 1996), des effets également produits par l'urocortine (Petraglia *et al.*, 1999). Le groupe de Challis a proposé que ces effets du CRF soient d'une part directs, et d'autre part indirects *via* la relâche locale d'ACTH (Jones et Challis, 1991). Ainsi puisque l'ocytocine et la prostaglandine $F_{2\alpha}$ sont, au même titre que les glucocorticoïdes, des sécrétagogues du CRF, nous sommes en présence d'une deuxième boucle amplificatrice.

Toutefois, l'effet du CRF peut être encore plus direct puisqu'il est lui même capable d'augmenter l'activité contractile du myomètre utérin *in vitro* (Quartero et Fry, 1989), en plus d'agir en synergie avec l'ocytocine (Quartero *et al.*, 1991,1992) et la

prostaglandine $F_{2\alpha}$ (Benedetto *et al.*, 1994). Ces effets constricteurs du CRF sur le myomètre sont attribuables aux récepteurs qui y sont présents, et dont l'affinité pour le CRF s'accroît dans les dernières semaines de grossesse (Hillhouse *et al.*, 1993). De façon surprenante, le CRF entraîne la relaxation des muscles lisses vasculaires même au niveau placentaire (Clifton *et al.*, 1994).

Brièvement, et pour terminer, voici un ordre chronologique des événements constituant le moteur de l'horloge placentaire. Au début de la grossesse, l'expression placentaire du CRF est faible (Frim *et al.*, 1988). Cette faible expression serait principalement attribuable à la synthèse *de novo* de la progestérone, par le placenta (Karalis *et al.*, 1996) et à l'inhibition de l'axe HHS fœtal par le cortisol maternel (Pepe et Albrecht, 1990). Vers la mi-grossesse, les surrénales fœtales produisent suffisamment de DHEAS pour fournir la synthèse placentaire d'œstriol (Pepe et Albrecht, 1990). Cette hausse d'œstriol stimulerait l'activité 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase, ce qui entraînerait une conversion du cortisol maternel en cortisone, un métabolite inactif (Pepe *et al.*, 1988 ; Burton et Waddell, 1999). L'élimination du cortisol d'origine maternelle leverait l'inhibition de l'axe HHS fœtal et permettrait une production accrue de DHEAS et de cortisol, par le fœtus (Pepe et Albrecht, 1995 ; McLean *et al.*, 1995 ; Burton et Waddell, 1999). Le cortisol, de par sa compétition avec la progestérone, stimulerait la production de CRF placentaire (Karalis *et al.*, 1996), qui à son tour, stimulerait l'axe HHS fœtal, générant ainsi la première boucle amplificatrice, accompagnant celle des prostaglandines déjà décrite. De même, l'hypercortisolémie pourrait être en partie responsable de la baisse de l'effet de la progestérone sur l'utérus lors des derniers jours de la grossesse. Cette amplification de la production du CRF, connaissant ses actions utérotoniques directes et indirectes, permettrait au peptide de favoriser le passage de l'utérus à l'étape ultime du travail. La production accrue de DHEAS, donc du 18-OH-DHEAS, serait responsable de l'installation des conditions initiales du travail en favorisant la production d'œstriol.

2.3. La gonadotropine chorionique

La hCG est une glycoprotéine de la même famille que l'hormone lutéinisante (LH), l'hormone folliculostimulante (FSH) et la thyrotropine (TSH) (Pierce et Parsons, 1981). Elle est composée d'une sous-unité α (commune à tous les membres de la famille) et d'une sous-unité β qui lui est propre (Pierce et Parsons, 1981). La hCG est sécrétée dès le stade de blastocyte (Hay et Lopata, 1988), et est probablement l'hormone placentaire la mieux caractérisée. Elle est détectable dans la circulation maternelle suite à l'implantation du blastocyte dans l'endomètre, soit 6-9 jours post-fécondation, sa concentration plasmatique augmente exponentiellement au cours des 8 semaines suivantes, et retourne à un niveau indétectable autour de la 18^e semaine (Catt *et al.*, 1975 ; Braunstein *et al.*, 1976).

2.3.1. Origine et régulation de la relâche de la gonadotropine chorionique

En ce qui a trait au site de relâche de la hCG, il semble que le syncytiotrophoblaste soit le seul site de synthèse de l'hétérodimère (Boime, 1991). Les cellules cytotrophoblastiques, quant à elles, ne synthétisent que la sous-unité α (Boime, 1991), tandis que l'endomètre utérin en phase sécrétoire, de même que la caduque, synthétisent la sous-unité β (Wolkersdorfer *et al.*, 1998). Une étude ultrastructurale montre qu'au niveau du syncytiotrophoblaste de placenta au premier trimestre de grossesse, la hCG se retrouve surtout dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, tandis qu'une faible partie (~15%) est mise en réserve dans des granules de sécrétion pour être relâchée par exocytose (Billingsley, et Wooding, 1990).

Le contrôle de la relâche de la hCG par les trophoblastes différenciés *in vitro* ressemble beaucoup à celui de la LH par l'hypophyse. Par exemple, la GnRH, dont l'ARN messenger et la protéine sont exprimés dans les cytotrophoblastes et le syncytiotrophoblaste (Khodr et Siler-Khodr, 1978a; Duello *et al.*, 1993), stimule la

relâche de la hCG par les cellules trophoblastiques *in vitro* (Khodr et Siler-Khodr, 1978b; Bélisle *et al.*, 1984). Cet effet de la GnRH a été proposé comme étant dépendant de l'interaction de l'hormone avec son ou ses récepteur(s) (Bélisle *et al.*, 1984,1987), et lié à une entrée du calcium par des canaux calciques, dont les L-VOCC (Bélisle *et al.*, 1989).

L'activine et l'inhibine, deux facteurs de croissance produits par l'amnios, la caduque, le chorion lisse et le placenta (Petraglia *et al.*, 1990a, 1991, 1993b) ont des effets antagonistes sur la relâche de la hCG. L'activine stimule *in vitro* la relâche de la hCG basale ou stimulée par la GnRH production par des trophoblastes purifiés à partir de placentas à terme (Petraglia *et al.*, 1989d). Tandis, l'inhibine inhibe la production de hCG par des trophoblastes purifiés à partir de placentas à terme, mais ne semble pas avoir cet effet sur des trophoblastes isolés à partir de placentas du premier trimestre (Mersol-Barg *et al.*, 1990). La follistatine, produite par les mêmes tissus, est une protéine liante de l'activine (Petraglia *et al.*, 1994), toutefois, aucune étude n'a vérifié si sa présence suffit à promouvoir l'effet de l'inhibine. Un autre facteur de croissance produit par le syncytiotrophoblaste et la caduque, le *Transforming growth factor-β* (TGF-β1) est à l'instar de l'inhibine, un inhibiteur *in vitro* de la relâche de la hCG (Morrish *et al.*, 1991 ; Graham *et al.*, 1992). Toutefois, l'effet inhibiteur du TGF-β1 est peut-être dû à la l'inhibition de la différenciation des trophoblastes en culture (Morrish *et al.*, 1991).

Certains opiacés, tels que la β-endorphine produite par l'amnios, la caduque, le chorion lisse et le placenta, notamment par le syncytiotrophoblaste (Odagiri *et al.*, 1971 ; Liotta *et al.*, 1982 ; Facchinetti *et al.*, 1990), et les dynorphines d'origine placentaire (Lemaire *et al.*, 1983), inhibent la relâche spontanée de la hCG par des cellules trophoblastiques ou des explants placentaires *in vitro* (Barnea *et al.*, 1991a,b).

Le placenta, bien que non-innervé, contient une importante concentration de norépinéphrine (Zhang *et al.*, 1991). La norépinéphrine stimule la relâche *in vitro* de la

hCG par des trophoblastes issus de placentas du premier trimestre (Shi et Zhuang, 1993). Un effet dépendant de l'activation de l'adénylyl cyclase et des L-VOCC. Une étude portant sur des trophoblastes isolés à partir de placentas à terme, montre qu'un agoniste des récepteurs β -adrénergiques ou l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) produisent les même effets (Guillon *et al.*, 1995).

2.3.2. Rôles physiologiques de la hCG.

Chez la mère, la prolongation de la vie du *corpus luteum*, et par le fait même sa production stéroïdienne (Strott *et al.*, 1969) semble être le rôle le plus crucial de la hCG pour la progression de la grossesse. En effet, sans cette extension de la phase lutéale, la formation de la caduque, déjà amorcée lors du cycle ovarien normal, ne serait pas finalisée, ce qui rendrait impossible toute poursuite de la grossesse (Caspo *et al.*, 1972). À cet égard, des études *in vitro* montrent que la hCG est suffisante pour induire le phénotype caduque à l'endomètre utérin, mais qu'elle nécessite l'implication de l'oestrogène et de la progestérone pour induire une caduque fonctionnelle (Han *et al.*, 1999). La progestérone a un effet inhibiteur sur la relâche de la hCG par les cellules trophoblastiques (Iwashita *et al.*, 1989), ce qui suggère la présence d'une boucle paracrine responsable de la fin de la production de la hCG, suite à la prise en charge de la production de progestérone par le placenta.

Au niveau des cytotrophoblastes purifiés à partir de placentas du premier tiers de grossesse, la hCG augmente la production de progestérone et induit une prolifération cellulaire (Yagel *et al.*, 1989), alors que dans le cas des cytotrophoblastes isolés à partir de placentas à terme, elle induit plutôt une différenciation (Shi *et al.*, 1993).

Chez le fœtus mâle, un des rôles importants de la hCG, est la promotion de la maturation testiculaire et la stimulation de la sécrétion testiculaire de la testostérone (Reyes *et al.*, 1974; Huhtaniemi *et al.*, 1977). Les testicules ne sont pas les seules glandes stéroïdiennes fœtales à être la cible de la hCG, car elle stimule également la production de déhydroépiandrostérone (DHEA) par les surrénales (Seron-Ferre *et al.*, 1978).

CHAPITRE TROISIÈME
PREMIER PAPIER

Human syncytiotrophoblast NPY receptors are located on

BBM and activate PLC-to-PKC axis

Jacques **Robidoux**¹, Lucie **Simoneau**², Serge **St-Pierre**³, Hafid **Ech-Chadli**² and Julie **Lafond**^{1,2,4}. ¹Département d'Obstétrique-Gynécologie, Faculté de médecine, Université de Montréal, ²Département des Sciences Biologiques and de ³Chimie, Université du Québec à Montréal, Montréal (Canada) Canada, H3C 3P8

*This work was presented, in part, at the Endocrine Society, June, 1996 at San Francisco, USA.

⁴ Address all correspondence to:

Dr. Julie Lafond

Université du Québec à Montréal

Département des Sciences Biologiques.

C.P. 8888, Succursale "Centre-Ville", Montréal, Québec, (Canada), H3C 3P8

Fax: (514) 987-4647; E-mail: lafond.julie@uqam.ca

Key words: placenta; neuropeptide Y; phospholipase C- β ; protein kinase C;

Abstract

Robidoux, J., Simoneau, L., St-Pierre, S. and Lafond, J. Neuropeptide Y (NPY) is abundant in plasma and amniotic fluid of women throughout pregnancy, during which its involvement in placental hormonogenesis has been proposed. In accordance to its putative role, the aim of this study was to characterize the human placental syncytiotrophoblast receptivity to NPY. Thus we performed this study on brush-border membranes (BBM) and basal plasma membranes (BPM). Specific ^{125}I -labeled NPY (^{125}I -NPY) binding to BBM was rapid (20 min), saturable, with a maximum binding capacity of 604 ± 100 fmol/mg protein, and of high affinity, with a dissociation constant of 11 ± 3 nM. No saturable binding could be shown in BPM. The rank order of affinity of NPY and related peptides to compete for ^{125}I -NPY binding sites was peptide YY (PYY) > NPY = [Leu³¹, Pro³⁴]NPY > $_{13-36}$ NPY >> polypeptide pancreatic (PP). It is noteworthy that PYY displaced only 45% of the binding sites. In BBM, both NPY and PYY were potent phospholipase C (PLC) stimulators, leading to a four- to fivefold increase of control phosphodiesterase activity. The later effect could be prevented by preincubation of membranes with 5 μM U-73122, a known inhibitor of G protein-linked receptor activation of PLC- β . Furthermore, 5 μM BIBP-3226, a Y₁-receptor antagonist, shifted both dose-response curves to the right in a similar fashion for both peptides. In accordance with the PLC stimulation, both peptides also induced stimulation of protein kinase C (PKC) activity, which could be partially but additively prevented by U-73122 and LY-294002, a selective inhibitor of phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K). Taken together, these data suggest that placental and blood derived NPY binds to a mixed population of receptors composed of Y₁ and Y₃ subtypes on the maternal side of the syncytiotrophoblast, where it can mediate its physiological purposes via the PLC- β and PI3K activation, both of which lead to PKC activation. However, because BIBP-3226 antagonized both effects, the physiological relevance of the apparent Y₃ fraction is still unsolved.

INTRODUCTION

Human placenta, fetal membranes (amnion and chorion), and maternal decidua play an important role in the maintenance of pregnancy, because of their ability to produce a large variety of bioactive peptides (28). Among these, neuropeptide tyrosine (neuropeptide Y ; NPY), first isolated from brain (40), is particularly abundant in plasma and amniotic fluid of women throughout pregnancy (27). The importance of this peptide in the gestational process is still unclear, but its synthesis by cytotrophoblastic cells, amnion, chorion, and decidua favor of an important physiological contribution (25, 26). Binding sites for NPY are present in all peripheral cells of terminal villi, which are composed of the outer syncytiotrophoblastic layer and of the inner cytotrophoblastic cells. In those cells, NPY has been implicated in the control of corticotropin-releasing factor (CRF) and inhibin release (29,30).

There is evidence that NPY and its related peptides, ie., peptide YY (PYY) and pancreatic polypeptide (PP), perform their physiological actions through interaction with at least nine receptor subtypes. These subtypes include the cloned Y_1 , Y_2 , Y_4/PP_1 , $Y_{5B/C}$, and Y_{5NAT} (3, 14, 19, 34, 45), the pharmacologically well-characterized Y_3 , PYY-preferring, and non-selective (2, 7, 43), and the recently added feeding receptor (24). The Y_1 , Y_2 , Y_4/PP_1 , Y_5 , Y_6 , the PYY-preferring, and non-selective subtypes are all linked to the inhibition of stimulated adenylate cyclase (2, 3, 7, 14, 19, 34, 45), whereas the Y_1 , Y_2 , Y_3 , Y_4/PP_1 subtypes are linked to the rise of intracellular calcium concentration (3, 19, 34, 43). The later effect has been shown in some (10, 37), but not all (20, 22) studies to be dependent on phospholipase C (PLC) activation. Recently, Nakamura *et al.* (23) showed that the Y_1 subtype is also linked to phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) and subsequently to the mitogen-activated protein kinase activation. Until now, the linking of the feeding receptor described by O'Shea *et al.* (24) to a second messenger system has not been explored. Moreover, the vast majority of the above effects have been suggested to be mediated via pertussis toxin-sensitive G-proteins (20, 22, 47).

In light of the putative role of NPY in hormonogenesis control and the polarized nature of the syncytiotrophoblast (46), the aim of this study was to investigate both human

syncytio-trophoblastic brush-border (BBM) and basal plasma (BPM) membranes receptivity to NPY and its related peptides and evaluate the possible modulation by NPY and PYY of adenylate cyclase and PLC activities, both known triggers of hormone release via an increase of subplasmalemmal calcium concentration.

Materials and methods

Preparation of syncytiotrophoblastic brush border (BBM) and basal plasma membranes (BPM). Membranes were purified from placental tissues collected according to established institutional ethical guidelines from St-Luc hospital (Montreal, PQ), mainly as described by Lafond et al. (17) with some modifications. After the amnion, chorion, and the decidual layer were removed, the tissue was minced and stirred for 45 min in 10 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)-*N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES) (pH 7.4) containing 270 mM mannitol, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mg/ml benzamidin, 10 μ M leupeptin [except for PLC and PKC experiments] and 0.5 μ g/ml aprotinin (Tris-HEPES-mannitol buffer). This homogenate was filtered through cotton gauze, the filtrate was centrifuged 15 min at 2 900 g, and the supernatant, from which BBM were prepared, was centrifuged at 150 000 g for 60 min. The placental tissue, from which BPM were prepared, was washed and stirred for an additional 45 min with the Tris-HEPES-mannitol buffer in presence of 10 mM EDTA, and was processed as the first homogenate. Both crude membrane preparations were separately suspended in 2 mM Tris-HEPES-mannitol buffer (pH 7.0) containing the same antiproteases and stirred for 20 min after the addition of 10 mM $MgCl_2$. Both mixtures were centrifuged 20 min, at 2 900 g for BPM and 3 600 g for the BBM. For BBM, the supernatant was centrifuged twice at 35 000 g for 30 min in Tris-HEPES-mannitol buffer, and purified membranes were stored at $-80^\circ C$ until use (except for PLC and PKC experiments, in which membranes were used fresh). For the BPM, the pellet was diluted in 10 mM Tris-HEPES buffer (pH 7.4) and stored at $-80^\circ C$ for 30 min. The thawed BPM were centrifuged 30 min at 90 000 g, and the pellet was suspended in Tris-HEPES buffer and layered on top of a 4%-10% discontinuous Ficoll gradient and centrifuged for 60 min at 60 000 g. The interface was collected and centrifuged twice at 35 000 g, and the purified membranes were stored at $-80^\circ C$ until use. Membrane purity was monitored by the measurement of alkaline phosphatase activity (BBM marker) as already described (17), and by the measurement of Na^+/K^+ -adenosinetriphosphatase (ATPase) activity (BPM marker) using the technique of Post and Sen (31).

Binding of ¹²⁵I-labeled NPY to syncytiotrophoblast membranes. Binding experiments were performed as previously described (18) with minor modifications. Briefly, membranes were washed and suspended in a binding buffer consisting of 20 mM HEPES (pH 7.4), 250 mM sucrose, 1% bovine serum albumin (BSA), 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 0.1 mM PMSF, 1 mg/ml bacitracin, 1 mg/ml benzamidin, 10 μM leupeptin, 20 μg/ml antipain, 1 μg/ml pepstatin, and 0.5 μg/ml aprotinin. Membranes (10 μg) were incubated in presence of increasing concentrations of ¹²⁵I-labeled NPY (¹²⁵I-NPY; 0.08-10 nM) in a final volume of 50 μl using 96-wells polyvinylidene fluoride (PVDF) Durapore filter (0.65 μm) plates from Millipore (Nepean, ON), presoaked with 4% BSA. Under these conditions nonspecific binding to the PDVF membrane is relatively low, ranging consistently between 0.73 and 0.85 % of the total count with no further reduction upon addition of 0.1 % polyethylenimine. Incubations were done at 37°C for 20 min (time necessary to reach equilibrium; data not shown), in the absence (total binding) or presence (nonspecific binding) of 5 μM unlabeled NPY and were stopped by rapid filtration, followed by four washes with 250 μl ice-cold binding buffer using a Multi-Screen system from Millipore. The radioactivity retained on the filters was measured in a γ-scintillation counter (Cobra II: auto-gamma, Canberra Packard, Montréal). Membrane protein content was assayed by the method of Bradford (6) using Bio-Rad protein assay reagent (Mississauga, ON), and BSA was used as standard.

Characterization of NPY receptor subtypes on BBM. Competition binding experiments were performed as described in *Binding of ¹²⁵I-NPY to syncytiotrophoblast membranes*, except that the incubation time was raised to 30 min (time necessary to reach equilibrium state with 2 competing ligands; data not shown). Membranes were incubated in presence of a fixed concentration of ¹²⁵I-NPY (1 nM) alone or with increasing concentrations (10⁻¹²-10⁻⁵ M) of unlabelled NPY, PYY, [Leu³¹, Pro³⁴]NPY, ₁₃₋₃₆NPY or PP.

D-Myo-inositol 1,4,5 triphosphate assay. BBM (50 μg/10μl) were added to a reaction mixture consisting of 20 mM HEPES (pH 7.45), 100 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 20

mM KCl, 2 mM MgSO₄, 1 mM NaH₂PO₄, 100 μM CdCl₂, 100 nM CaCl₂, 100 μM PMSF, 1 mg/ml bacitracin, 1 mg/ml benzamidin, 20 μg/ml antipain, 1 μg/ml pepstatin, 0.5 μg/ml aprotinin, and 0.05% BSA in a final volume of 50 μl. Membranes were incubated at 37°C under shaking (90 cycles/min) in the presence of increasing concentrations (10⁻¹¹ -10⁻⁶ M) of NPY or PYY, and the reaction was stopped 1 min later by the addition of perchloric acid (5% final concn) and albumin (0.2% final concn). In one set of experiments, membranes were preincubated for 5 min with 5 μM 1-(6-β17 -3-methoxyestra-1,3,5-(10)triene-17-yl]amino/hexyl)1H-pyrroledione (U-73122) before being exposed to 10⁻⁷ M NPY or PYY for 1 min. In another set of experiments, membranes were preincubated for 5 min 2 μM BIBP-3226 and stimulated with increasing concentrations (10⁻¹¹ -10⁻⁶ M) of NPY or PYY. Membranes D-myo-inositol 1,4,5-triphosphate [Ins(1,4,5)P₃] production derived from the endogenous phosphatidylinositol 4,5-biphosphate [PtdIns(4,5)P₂] pool was measured by the protein binding method of Challiss et al.(9) using the Ins(1,4,5)P₃ [³H] assay system from Amersham Canada.

PKC assay. Membrane-associated PKC activity was measured mainly as previously described by Chakravarthy *et al.* (8), using myristoylated Ala-rich C kinase substrate (MARCKS) as a selective PKC substrate. Briefly, membranes (20 μg/4 μl) were added to a reaction mixture containing 100 μM MARCKS in a final volume of 16 μl consisting of 40 mM HEPES (pH 7.45), 25 mM NaHCO₃, 2 mM MgSO₄, 1 mM NaH₂PO₄, 1 mM NaF, 100 μM Na vanadate, 100 μM Na pyrophosphate, 100 nM CaCl₂, 10 μM [^γ-³²P]ATP (~10-15 μCi), 100 μM PMSF, 1 mg/ml benzamidin, 1 μg/ml pepstatin, 0.5 μg/ml aprotinin, and 0.05% BSA. The reaction was carried out under shaking (90 cycles/min) over 3 min at 37°C in presence of increasing concentrations (10⁻¹¹ -10⁻⁷ M) of NPY or PYY, was stopped by the addition of sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer [final concn 4% (wt/vol) SDS, 0.01 M EDTA, 0.25 M sucrose, 0.083 M dithiothreitol, 0.08% (wt/vol) bromophenol blue], and was boiled for 5 min. In one set of experiments, membranes were preincubated for 5 min with 5 μM U-73122, 100 nM calphostin C (specific PKC inhibitor at this concentration), or 10 μM LY-294002

before being exposed to 10^{-7} M NPY or PYY for 3 min. In another set of experiments, membranes were preincubated for 5 min with $5 \mu\text{M}$ BIBP-3226 and stimulated with increasing concentrations (10^{-11} - 10^{-7} M) of NPY or PYY. Samples were loaded on an alkaline tricine-SDS-polyacrylamide gel electrophoresis system consisting of a 4% acrylamide stacking gel and a 12% acrylamide-glycerol separating gel, as described by Schagger and Von Jagow (36). After migration, gels were fixed in 50% (vol/vol) methanol and 10% (vol/vol) acetic acid for 30 min, stained in 10% acetic acid, 0.25% (wt/vol) Coomassie blue R-250 for 15 min, and washed by three 5-min washes with 25% methanol, 10% acetic acid. The phosphorylated peptide was then detected on the polyacrylamide gels by autoradiography performed at 4°C and quantified with the Personal Densitometer from Molecular Dynamics and the ImageQuant software (Sunnyvale, CA).

Statistics and curves analysis. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test. Differences were considered significant when *P* values were <0.05 . Binding experiment data and concentration-response data were analyzed using computerized nonlinear regression analysis using PRISM (version 1.02) from GraphPad Software (San Diego, CA).

Reagents. Human NPY, [Leu³¹, Pro³⁴]-NPY and ₁₃₋₃₆NPY were synthesized as previously described (12) as was porcine PYY and PP. [¹²⁵I]NPY was purchased from Amersham (Oakville, Ont, Canada). Leupeptin, antipain, pepstatin and aprotinin were purchased from Boehringer Mannheim (Laval, Canada). Bacitracin, PMSF, benzamidin, bovine serum albumin (BSA) fraction V and ATP were purchased from Sigma Chemicals, Co (St-Louis MO, USA). U73122 were purchased from RBI (Natick, MA, USA), [γ -³²P]ATP from ICN Pharmaceuticals (Montréal, Canada) and MARKS-PKD from BIOMOL (Plymouth Meeting, PA, USA).

Results

Characterization of membrane fractions. The BBM used in this study were of high quality since they were enriched in alkaline phosphatase, a BBM marker, 36 ± 4 -fold compared with the homogenate of the corresponding placental tissue. The cross-contamination with BPM was low because Na^+/K^+ -ATPase activity, a marker for BPM, was in these BBM enriched only by 4.0 ± 0.5 -fold. The purity of the BPM used in this study was good as determined by the Na^+/K^+ -ATPase activity since their enrichment was 24 ± 2 -fold and cross-contamination was in the published range with 6.0 ± 0.5 -fold (1, 18).

Characterization of ^{125}I -NPY binding to syncytiotrophoblast membranes. The specific binding of ^{125}I -NPY to syncytiotrophoblastic BBM of human term placenta was rapid and reached apparent equilibrium conditions within 20 min (data not shown). Isotherm saturation binding under these conditions demonstrated a saturable high affinity ^{125}I -NPY binding with dissociation constant and maximum binding capacity values of 11 ± 3 nM and 604 ± 100 fmol/mg of membrane proteins, respectively (Fig. 1A). Specific binding to BPM (caused by much higher nonspecific binding) was negligible and nonsaturating (Fig. 1B).

Characterization of NPY receptor subtypes. To characterize the pharmacology of the receptor subtypes present in BBM of human term syncytiotrophoblast, we performed competition experiments using increasing concentrations of NPY, PYY, $[\text{Leu}^{31}, \text{Pro}^{34}]\text{NPY}$, $_{13-36}\text{NPY}$ and PP. All peptides used caused a progressive displacement of the $[\text{Leu}^{31}, \text{Pro}^{34}]\text{NPY}$ binding to BBM (Fig. 2). NPY and $[\text{Leu}^{31}, \text{Pro}^{34}]\text{NPY}$ were the most potent competitors of ^{125}I -NPY binding sites; PYY displaced with high affinity ~45% of the binding sites but was unable to displace the other portion up to 10^{-5} M. Moreover, $_{13-36}\text{NPY}$ displaced ^{125}I -NPY (with ~7-fold less affinity than NPY), whereas PP displaced ^{125}I -NPY binding with 150-fold less affinity (Table 1).

The modulation of Ins(1,4,5)P₃ production by NPY and PYY. After a 1-min stimulation with increasing concentrations of NPY or PYY, formation of Ins(1,4,5)P₃, the direct product of the breakdown of PtdIns(4,5)P₂ catalyzed by PLC, was raised in a concentration-dependent manner (Fig. 3). Moreover, this figure shows that both peptides possess similar sensitivity with a pEC₅₀ of 10.17 ± 0.27 and 10.06 ± 0.38 for NPY and PYY, respectively, and similar efficiency, with a maximal effect being reached at 100 nM for both peptides. To determine whether the PLC activity associated with NPY or PYY stimulation was of the PLC β-type, BBM were preincubated 5 min with or without 5 μM U-73122 (inhibitor of G protein-linked mediated PLC-β activation). As shown in Fig. 4, an incubation of BBM for 1 min, in presence of 100 nM NPY or PYY resulted in a highly significant increase of the Ins(1,4,5)P₃ production compared with the basal values ($P < 0.005$ and 0.01 , respectively), whereas in the presence of 5 μM U-73122, the increase of the Ins(1,4,5)P₃ production was completely abolished (stimulated vs. basal, $P > 0.5$ and 0.3 , respectively) for NPY and PYY. In an attempt to define which binding sites could be attributed the PLC-β stimulating effect, we used BIBP-3226, a highly potent and selective nonpeptide Y₁ receptor antagonist. Surprisingly BIBP-3226 displayed a similar antagonistic activity on both NPY (Fig 5) and PYY (data not shown) effects, with an rightward shift of ~2 log.

The stimulation of Membrane-associated PKC activity by NPY and PYY. In conditions similar to those used for assessing PLC activity, although the 1,2-diacylglycerol concomitently generated with Ins(1,4,5)P₃ is not the sole way to activate membrane-associated PKC, we measured the ability of both NPY and PYY to modulate membrane-associated PKC activity. Figure 6 shows that both peptides, in a dose-dependent manner, stimulate MARCKS-psd phosphorylation, although NPY was more efficient, than PYY. Interestingly, PYY was slightly more potent than NPY since the pEC₅₀ were 11.26 ± 0.32 and 8.90 ± 0.23 for PYY and NPY, respectively. As for PLC activity MARCKS-psd phosphorylation was markedly influenced by BIBP-3226; however, the rightward shift of the dose-response curves was more pronounced in the phosphorylation assays (Fig.7). Further studies were then conducted to evaluate whether the inhibition of PLC was

sufficient to inhibit the subsequent stimulation of PKC activity (Fig. 8). In these experiments, 5 μ M U-73122 was unable to counteract completely the PKC stimulation by both peptides, suggesting an alternative way of stimulation. Using the same conditions, 100 nM calphostin C, a non-subtype selective PKC inhibitor, abolished PKC activity. In another experiment, we wanted to verify if PI3K was one of the alternative ways. As shown in Fig. 9, 10 μ M LY-294002 reduced PKC activity significantly (P values were <0.05), an effect that was additive to the effect of U-73122 since a combination of both inhibitors leaves no residual activity.

Discussion

The syncytiotrophoblast is a single continuous structure covering the entire outer surface of the villous tree and, as such, is strategically devoted to pivotal role in maternal-fetal communications. In accordance with its putative endocrine role, the syncytiotrophoblast is a major source of a large variety of peptide hormones (28), that include inhibin (32), and CRF (33), two important factors in the maintenance and the termination of a successful pregnancy. Maternal decidua, chorion, amnion, and cytotrophoblastic cells, also release many peptide hormones (28); among them, NPY may have an important endocrine, paracrine, or autocrine role and has been, in that respect, associated with the syncytiotrophoblastic release of CRF and inhibin (29,30). Thus, because the syncytiotrophoblast is polarized, its plasma membranes being constituted of two distinct zones, a BBM facing the maternal side and a BPM facing the fetal side, the first aim of the present study was to characterize the NPY binding sites of both domains of the human term syncytiotrophoblast. In contrast to BPM, the specific binding of ^{125}I -NPY to BBM was rapid, saturable, and of high affinity. This implies that NPY must come from the maternal blood surrounding the villous tree to reach its binding sites, because BBM face the intervillous space.

The recent cloning of $Y_{5\text{JBC}}$ and $Y_{5\text{NAT}}$ receptor subtypes complicates the pharmacological subtype classification of NPY/PYY receptors because the NPY analogue [Leu^{31} , Pro^{34}]NPY, typically an Y_1 -agonist (13), shows agonistic properties for Y_1 , $Y_{5\text{JBC}}$, and $Y_{5\text{NAT}}$ receptor subtypes (14, 45). However, because the primate ortholog of the $Y_{5\text{JBC}}$ gene does not bind NPY, PYY, or their analogs (21), it becomes unlikely that the NPY binding site described in the present paper is the $Y_{5\text{JBC}}$ subtype. Long carboxy-terminal fragments, such as $_{13-36}\text{NPY}$ still preferentially bind to the Y_2 receptor (44), and PYY does not bind to Y_3 subtype (43). In accordance with the above nomenclature, we propose that ^{125}I -NPY binding sites on syncytiotrophoblast BBM are constituted of a mixed-receptor population constituted of Y_1 -like (~55%) and Y_3 (~45%) types. It is also tempting to classify Y_1 -like receptors present in BBM as a Y_1 receptors

because Y_{SNAT} receptors are found primarily, if not exclusively, in discrete regions of the brain (14). However, the known analogy between the hypothalamo-pituitary axis and the cytotrophoblastic-syncytiotrophoblastic axis renders this assumption quite presumptuous. It has been shown that NPY and PYY, in cells expressing Y_1 -like or Y_3 receptors, mobilize calcium from intracellular stores or, in the case of Y_1 -like subtype, also inhibit adenylate cyclase activity (43). However, there is no consensus on the ability of NPY and PYY to enhance turnover of inositol lipids. Some investigators found that NPY induces the stimulation of PLC (10, 37), but others did not (20, 22). However, all these effects are mediated via pertussis toxin-sensitive heterotrimeric G_i and G_o proteins (20, 22, 47). Because α_o - and α_i - subunits cannot directly activate PLC, a mechanism involved in the pertussis toxin-sensitive process has recently been proposed (15, 38). The ligand-receptor interaction would lead to the activation of the pertussis toxin-sensitive heterotrimeric G proteins, and consequently to the release of the $\beta\gamma$ dimer, which then activates PLC. The activation of PLC leads, in turn, to the phosphodiesteratic cleavage of $PtdIns(4,5)P_2$, yielding 1,2-diacylglycerol production, which stimulates classical and new PKC isotypes, and $Ins(1,4,5)P_3$ production, which by the binding to its receptors, mobilizes calcium from intracellular stores to cytosol (4). To establish whether the NPY binding sites described here represent a physiologically relevant receptor site in the syncytiotrophoblastic BBM, we attempted to study their relationship with the above-mentioned second messenger systems. Despite the presence of both G_o and G_i proteins in the BBM of the syncytiotrophoblast (11), the exclusive presence of adenylate cyclase in BPM (17, 46) prompted us to explore the coupling of the NPY binding sites to PLC modulation. The effect of NPY and PYY on the $Ins(1,4,5)P_3$ production shown in this study on isolated BBM is in agreement with the study of Daniels *et al.* (10) and Shigeri *et al.* (37). The use of a highly selective $Ins(1,4,5)P_3$ protein binding assays, in association with the addition of $CdCl_2$, a powerful inhibitor of $Ins(1,4,5)P_3$ -5-phosphatase activity (39), might explain the discrepancy with those groups who could not find evidence of PLC activation although showing rise in intracellular calcium concentration. The identical curves obtained for these peptides also suggest that NPY and PYY stimulate PLC *via* the same receptors, even if we did not

address the question directly in the present study. To assess whether the PLC activity measured was of the β -type, we used U-73122, a new aminosteroid inhibitor of PLC- β activation by G protein-linked receptors (41). The complete abolition by U-73122 of NPY and PYY stimulation of Ins(1,4,5) P_3 accumulation suggests that the effect of both peptides is mediated through activation of PLC- β . Additionally, the magnitude of the rightward shift of the dose-response curves in presence of BIBP-3226 suggest that the Y_1 receptor is the primary binding site associated with the effect of both peptides on PLC- β . Moreover, the antagonist does not antagonize effects attributed to the Y_{5NAT} receptor described (14). Nevertheless, even if both peptides activate PLC- β in our membrane preparations, it seems more likely that the physiological ligand of the human term syncytiotrophoblast BBM is NPY, because its concentration is preponderant during the course of pregnancy (27). Having in mind the putative role of NPY in the release of CRF and inhibin (32, 33), it is appropriate to monitor the activity of PKC (35). Additional experiments were performed to measure this activity directly in our membrane preparation. However, it must be kept in mind that the PKC activity showed corresponds to the activation via newly liberated activators of a fraction of the enzyme already associated to the membrane preparation (1, 8), and cannot account for the possible induction of translocation by the peptides. Nevertheless, both NPY and PYY were potent inducers of PKC activity. PYY has, however, a higher potency than NPY, which is consistent with its higher affinity as measured in the competition experiment, and NPY is more efficient, which suggests the stimulation of different pools of PKC or a more efficacious coupling between NPY and the stimulation of PKC via other ways than PLC. However, this hypothesis assumes that because BIBP-3226 antagonized both peptides, different transition states of the Y_1 receptor will be differentially stabilized by NPY and PYY. One of these transition state could be preferentially coupled to PLC and the other state to an alternative effectors. This phenomenon is well known in other systems (16) but to our knowledge has not been published for NPY receptors. The incomplete inhibition of PKC activation by U-73122 for both peptides, also suggests that both peptides utilize an alternative way of PKC activation. Although not excluding other potential ways the result obtained after PI3K inhibition favor this glycerophospholipid

kinase as a major way by which NPY activate PKC. Thus $\text{PtIns}(3,4,5)\text{P}_3$, resulting of the 3-kinase activity could substitute $\text{PtIns}(4,5)\text{P}_2$, a poor activator of PKC, in the activation of some PKC isoenzymes (5), probably the ϵ isotype that is predominant in BBM of human syncytiotrophoblast (1). Finally, the nature of the PKC stimulated by these peptides, even if not addressed in the present study, should probably exclude atypical subtypes, since MARCKS does not seem to be a substrate for both ζ - and λ -PKC (42).

In conclusion, this study demonstrates that the syncytiotrophoblast harbors NPY/PYY receptors, and that in accordance to the polarized nature of the syncytiotrophoblast, nonequivocal saturable binding could be found on the maternal side only. Furthermore, the results provide evidence that these receptors are linked to PLC and PI3K activation, both of which lead to PKC activation. These observations are the first steps in the understanding of the mechanism of NPY action already described in human term syncytiotrophoblast.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to Dr. André Masse (Chief of Obstetrics Service), and Thérèse Blackburn (Chief of Nursing), and the staff of Department of Obstetrics and Gynecology for the donation of placentas, and acknowledge the skillful technical assistance of Fatiha Moukdar and Mélanie Laramé. This study was supported by grants from Université du Québec a Montreal (J. Lafond) J. Robidoux is the recipient of a Fonds de Recherche en Santé au Québec pour la Formation de Chercheurs et l'aide à la Recherche Santé (FRSQ-FCAR-Santé) doctoral studentship.

References

1. **Amane A, Simoneau L, Savard R, Lafond J** 1995 Identification and chromatographic separation of protein kinase C isotypes in syncytiotrophoblast brush border membranes and basal plasma membranes of human placenta. *Int J Biochromato* 1: 237-246
2. **Ballantyne GH, Goldenring JR, Fleming FX, Rush S, Flint JS, Fielding P, Binder H, Modlin IM** 1993 Inhibition of VIP-stimulated ion transport by a novel Y-receptor phenotype in rabbit distal colon. *Am J Physiol* 264: G848-G854
3. **Bard JA, Walker MW, Branchek TA, Weinshank RL** 1995 Cloning and functional expression of a human Y4 subtype receptor for pancreatic polypeptide, neuropeptide Y, and peptide YY. *J Biol Chem* 270: 26762-26765
4. **Berridge MJ, Irvine RF** 1989 Inositol phosphates and cell signaling. *Nature* 341: 197-205
5. **Blobe GC, Stribling S, Obeid LM, Hannun YA** 1996 Protein Kinase C isoenzymes: Regulation and function. *Cancer Surveys* 27: 213-248
6. **Bradford MM** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
7. **Castan I, Valet P, Voisin T, Quideau N, Laburthe M, Lafontan M** 1992 Identification and functional studies of a specific peptide YY-preferring receptor in dog adipocytes. *Endocrinology* 131: 1970-1976

8. **Chakravarthy BR, Bussey A, Whitfield JF, Sikorska M, Williams RE, Durkin JP** 1991 The direct measurement of protein kinase C (PKC) activity in isolated membranes using a selective peptide substrate. *Anal Biochem* 196: 144-150
9. **Challiss RAJ, Batty IH, Nahorski SR** 1988 Mass measurements of inositol (1,4,5) triphosphate in rat cerebral cortex slices using a radioreceptor assay: effects of neurotransmitters and depolarization. *Biochem Biophys Res Commun* 157: 684-691
10. **Daniels A, Lazarowski E, Matthews J, Lapetina E** 1989 Neuropeptide Y mobilizes intracellular Ca^{2+} and increases inositol phosphate production in human erythroleukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun* 165: 1138-1144
11. **El Mabrouk M, Simoneau L, Bouvier C, Lafond J** 1996. Asymmetrical distribution of G proteins in syncytiotrophoblastic brush-border and basal-plasma membranes of human term placenta. *Placenta* 17: 471-477
12. **Forest M, Martel JC, St-Pierre S, Quirion R, Fournier A** 1990 Structural study of N-terminal segment of neuropeptide tyrosine. *J Med Chem* 33: 1615-1619
13. **Fuhlendorff J, Gether U, Aakerlund L, Langeland-Johansen N, Thogersen H, Melberg SG, Olsen UB, Thastrup O, Schwartz TW** 1990 [Leu³¹,Pro³⁴] neuropeptide Y: a specific Y₁ receptor agonist. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 182-186
14. **Gerald C, Walker MW, Criscione L, Gustafson EL, Batzl-Hartmann C, Smith KE, Vaysse P, Durkin MM, Laz TM, Linemeyer DL, Schaffhauser AO, Whitebread S, Hofbauer KG, Taber RI, Branchek TA, Weinshank RL** 1996 A receptor subtype involved in neuropeptide-Y-induced food intake. *Nature* 382: 168-171

15. **Katz A, Wu D, Simon MI** 1992 Subunits $\beta\gamma$ of heterotrimeric G protein activate $\beta 2$ isoform of phospholipase C. *Nature* 360: 686-689
16. **Kenakin T** 1996 The classification of seven transmembrane receptors in recombinant expression systems. *Pharmacol Rev* 48: 413-463
17. **Lafond J, Auger D, Fortier J, Brunette MG** 1988 Parathyroid hormone receptor in human placental syncytiotrophoblast brush border and basal plasma membrane. *Endocrinology* 123: 2834-2840
18. **Lafond J, Simoneau L, Savard R, Lajeunesse D** 1994 Calcitonin receptor in human placental syncytiotrophoblast brush border and basal plasma membranes. *Mol Cell Endocrinol* 99: 285-292
19. **Larhammar D, Blomqvist AG, Yee F, Jazin E, Yoo H, Wahlestedt C** 1992 Cloning and functional expression of a human neuropeptide Y/peptide YY receptor of the Y1 type. *J Biol Chem* 267: 10935-10938
20. **Lobaugh L, Blackshear P** 1990 Neuropeptide Y binding and inhibition of cAMP accumulation in human neuroepithelioma cells. *Am J Physiol* 258: C913-C922
21. **Matsumoto M, Nomura T, Momose K, Ikeba Y, Kondou Y, Akiho H, Togami J, Kimura Y, Okada M, Yamaguchi T** 1996 Inactivation of a novel neuropeptide Y/peptide YY receptor gene in primate species. *J Biol Chem* 271: 27217-27220
22. **Motulsky H, Michel M** 1988 Neuropeptide Y mobilizes Ca^{2+} and inhibits adenylate cyclase in human erythroleukemia cells. *Am J Physiol* 255: E880-E885

23. **Nakamura M, Sakanaka C, Aoki Y, Ogasawara H, Tsuji T, Kodama H, Matsumoto T, Shimizu T, Noma M** 1995 Identification of two isoforms of mouse neuropeptide Y-Y1 receptor generated by alternative splicing: isolation, genomic structure, and functional expression of the receptors. *J Biol Chem* 270: 30102-30110
24. **O'Shea D, Morgan DGA, Meeran K, Edwards CMB, Turton MD, Choi SJ, Heath MM, Gunn I, Taylor GM, Howard JK, Bloom CI, Small CJ, Haddo O, Ma JJ, Callinan W, Smith DM, Ghatei MA, Bloom SR** 1997 Neuropeptide Y induced feeding in rat is mediated by a novel receptor. *Endocrinology* 138: 196-202
25. **Petraglia F, Calza L, Giordino L, Sutton S, Marrama P, Rivier J, Genazzani AR, Vale W** 1989 Identification of immunoreactive neuropeptide-Y in human placenta: localization, secretion, and binding sites. *Endocrinology* 124: 2016-2022
26. **Petraglia F, Calza L, Giordino L, Zanni M, Florio P, Ferrari AR, Nappi C, Genazzani AR** 1993 Maternal decidua and fetal membranes contain immunoreactive neuropeptide Y. *J Endocrinol Invest* 16: 201-205
27. **Petraglia F, Coukos G, Battaglia C, Bartolotti A, Nappi C, Volpe A, Segre A, Genazzani AR** 1989 Plasma and amniotic fluid immunoreactive neuropeptide Y. *J Clin Endocrinol Metab* 69: 324-328
28. **Petraglia F, Florio P, Nappi C, Genazzani AR** 1996 Peptide signaling in human placenta and membranes: autocrine, paracrine, and endocrine mechanisms. *Endocrine Rev* 17: 156-186
29. **Petraglia F, Sutton S, Vale W** 1989 Neurotransmitters and peptides modulate the release of immunoreactive corticotropin-releasing factor from human cultured placental cells. *Am J Obstet Gynecol* 160: 247-251

30. **Petraglia F, Vale W** 1988 Role of inhibin-related peptides in human placenta. In: Hodgen, G.D., Rosenwalks, Z., Speler, J.M. *Nonsteroidal gonadal factors: physiological roles and possibilities in contraceptive development*. The Jones Institute Press. 181-191
31. **Post RA, Sen AK** 1967 Sodium and potassium stimulated ATPase. *Methods Enzymol* 10: 762-768
32. **Qu J, Ying SY, Thomas K** (1992). Inhibin production and secretion in human placental cells cultured *in vitro*. *Obstet Gynecol* 79: 705-712
33. **Riley SC, Watson JC, Herlick JM, Challis JRG** 1991 The localization and distribution of corticotropin-releasing hormone in the human placenta and the fetal membranes throughout gestation. *J Clin Endocrinol Metab* 72: 1001-1007
34. **Rose PM, Fernandes P, Lynch JS, Frazier ST, Fisher SM, Kodukula K, Kienzle B, Seethala R** 1995 Cloning and functional expression of a cDNA encoding a human type 2 neuropeptide Y receptor. *J Biol Chem* 270: 22661-22664
35. **Sarafian T, Pradel LA, Henry JP, Aunis D, Bader MF** 1991 The participation of annexin II (calpactin 1) in calcium-evoked exocytosis requires protein kinase C. *J Cell Biol* 114: 1135-1147
36. **Schägger H, von Jagow G** 1987 Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for separation of proteins in the range from 1 to 100 KDa. *Anal Biochem* 166: 368-379
37. **Shigeri Y, Nakajima S, Fujimoto M** 1995 Neuropeptide YY1 receptors-mediated increase in intracellular Ca^{2+} concentration *via* phospholipase C-dependent pathway in porcine aortic smooth muscle cells. *J Biochem* 118: 515-520

38. **Smrcka AV, Steirnweis PC** 1993 Regulation of purified subtypes of phosphatidyl inositol-specific phospholipase C β by G protein α and $\beta\gamma$ subunits. *J Biol Chem* 268: 9667-9674
39. **Storey DJ, Shears SB, Kirk CJ, Michell RH** 1984 Stepwise enzymatic dephosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate to inositol in liver. *Nature* 312: 374-376
40. **Tatemoto K, Carlquist M, Mutt V** 1982 Neuropeptide Y-a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature* 296: 659-660
41. **Thompson AK, Mostafapour SP, Denlinger LC, Bleasdale JE, Fisher SK** 1991 The aminosteroid U-73122 inhibits muscarinic receptor sequestration and phosphoinositide hydrolysis in SK-N-SH neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 266: 23856-23862
42. **Überall F, Giselbrecht S, Hellbert K, Fresser F, Bauer B, Gschwendt M, Grunicke HH, Baier G** 1997 Conventional PKC- α , Novel PKC- ϵ and PKC- θ , but not atypical PKC- λ are MARCKS kinases in intact NIH 3t3 fibroblasts. *J Biol Chem* 272: 4072-4078
43. **Wahlestedt C, Regunathan S, Reis DJ** 1992 Identification of cultured cells selectively expressing Y1-, Y2-, or Y3-type receptors for neuropeptide Y/peptide YY. *Life Sci* 50: PL7-PL12
44. **Wahlestedt C, Yanaihara N, Håkanson R** 1986 Evidence for different pre- and post-junctional receptors for neuropeptide Y and related peptides. *Regul Pept* 13: 317-328

45. **Weinberg DH, Sirinathsinghji DJS, Tan CP, Shiao LL, Morin N, Rigby MR, Heavens RH, Rapoport DR, Bayne ML, Cascieri MA, Strader CD, Linemeyer DL, MacNeil DJ** 1996 Cloning and expression of a novel neuropeptide Y receptor. *J Biol Chem* 271: 16435-16438
46. **Whitsett JA** 1980 Specialization in plasma membranes of the human placenta. *J Pediatr* 96: 600-604
47. **Zhu J, Li W, Toews ML, Hexum TD** 1992 Neuropeptide Y inhibits forskolin-stimulated adenylate cyclase in bovine adrenal chromaffin cells via a pertussis toxin-sensitive process. *J Pharmacol Exp Ther* 263: 1479-1486

Legends

Fig.1. Saturation curves of ^{125}I -labeled neuropeptide Y (^{125}I -NPY) binding to brush-border (BBM; A) and basal plasma (BPM; B) membranes of syncytiotrophoblast from human term placenta at 37°C for 20 min. Data are means \pm SE from 3 experiments done in triplicate. Nonlinear regression analysis were performed using PRISM version. 1.02 from GraphPad.

Fig.2. Ligand competition curves for ^{125}I -NPY binding to BBM of syncytiotrophoblast from human term placenta. The ^{125}I -NPY concentration was 1 nM and the incubation time was 30 min at 37°C . Data are means \pm SE from 3 experiments done in triplicate. Competition analysis were performed by PRISM version 1.02 from GraphPad. PP, pancreatic polypeptide ; PYY, peptide YY.

Fig. 3. D-myo-inositol 1,4,5-triphosphate [$\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$] production in BBM of syncytiotrophoblast in presence of increasing concentration of NPY or PYY. Membranes were incubated at 37°C for 1 min, and $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ production derived from endogenous phosphatidylinositol 4,5-biphosphate [$\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$] was assayed using $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ [^3H]assay system from Amersham. Data are means \pm SE from 4 experiments done in triplicate.

Fig. 4. Effects of U-73122 on the $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ production stimulated by NPY or PYY in BBM of syncytiotrophoblast. Membranes were preincubated 5 min with $5\ \mu\text{M}$ U-73122, and reaction was initiated by the addition of NPY or PYY. Membranes $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ production derived from endogenous $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ was measured using $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ [^3H]assay system from Amersham. Data are expressed as percentage of respective control and are means \pm SE from 3 experiments done in triplicate.

Fig. 5. Ins(1,4,5)P₃ production in BBM of syncytiotrophoblast in presence of increasing concentration of NPY or PYY after 5-min preincubation with 5 μM BIBP-3226 or solvent. Membranes were incubated at 37°C for 1 min, and Ins(1,4,5)P₃ production derived from endogenous PtdIns(4,5)P₂ was assayed using Ins(1,4,5)P₃ [³H]assay system from Amersham. Data are means ± SE from 4 experiments done in triplicate.

Fig. 6. Protein kinase C (PKC) activation in BBM of syncytiotrophoblast in presence of increasing concentration of NPY or PYY. Membranes were incubated at 37°C for 3 min, and PKC activity was measured using myristoylated Ala-rich C kinase substrate-protein phosphorylated site domain (MARCKS-psd) peptide as phosphorylation substrate. After separation on alkaline tricine-SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and autoradiography, phosphorylation was evaluated using the Personal Densitometer from Molecular Dynamics and ImageQuant software. Data are expressed as percentage of control and are means ± SE from 3 experiments.

Fig. 7. PKC activation in BBM of syncytiotrophoblast in presence of increasing concentration of NPY or PYY after 5-min preincubation with 5 μM BIBP-3226 or solvent. Membranes were incubated at 37°C for 3 min, and PKC activity was measured using MARCKS-psd peptide as phosphorylation substrate. After separation on alkaline tricine-SDS-PAGE and autoradiography, phosphorylation was evaluated using the Personal Densitometer from Molecular Dynamics and ImageQuant software. Data are expressed as percentage of control and are means ± SE from 3 experiments.

Fig. 8. Effects of U-73122 or calphostin C on PKC activity in BBM of syncytiotrophoblast incubated at 37°C for 1 min in presence of 100 nM of NPY or PYY. Membrane-associated PKC activity was measured using MARCKS-psd as phosphorylation substrate followed by separation on alkaline tricine-SDS-PAGE and autoradiography. Phosphorylation was evaluated using Personal Densitometer from Molecular Dynamics and ImageQuant software. Results are expressed as percentage of control and are Means ± SE from 2 experiments.

Fig. 9. Effects of U-73122 (U), LY294002 (LY), or both on PKC activity in BBM of syncytiotrophoblast incubated at 37°C for 1 min in presence of 100 nM of NPY or PYY. Membrane-associated PKC activity was measured using MARCKS-psd as phosphorylation substrate followed by separation on alkaline tricine-SDS-PAGE and autoradiography. Phosphorylation was evaluated using Personal Densitometer from Molecular Dynamics and ImageQuant software. Results are expressed as percentage of control and are Means \pm SE from 2 experiments.

Table 1. NPY and related peptides affinities for ^{125}I -NPY binding sites in BBM of syncytiotrophoblast from human term placenta.

PEPTIDES	pIC_{50}
PYY	10.50 ± 0.52
NPY	9.02 ± 0.12
$[\text{Leu}^{31}, \text{Pro}^{34}]$ -NPY	9.16 ± 0.33
$_{13-36}\text{NPY}$	8.18 ± 0.38
PP	6.84 ± 0.15

Values are means \pm SE ; n = 3 experiments. NPY, neuropeptide Y ; PP, pancreatic polypeptide ; PYY, peptide YY.

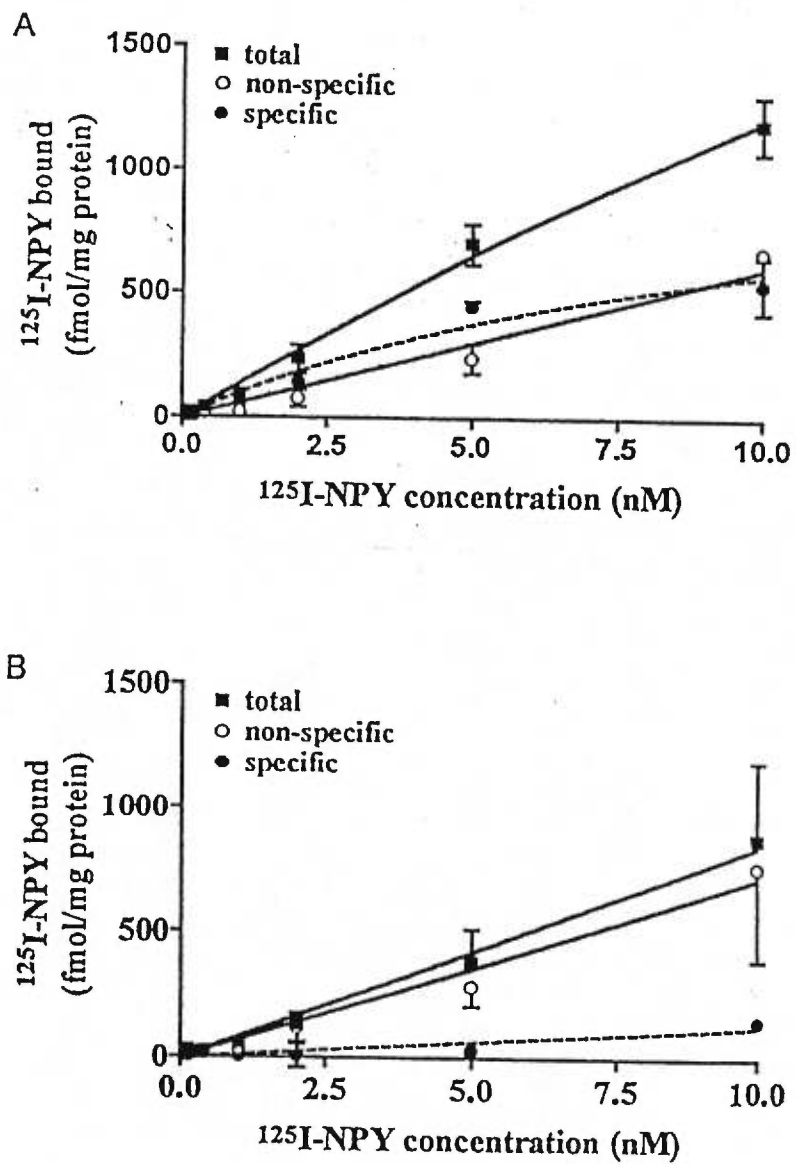


Fig. 1

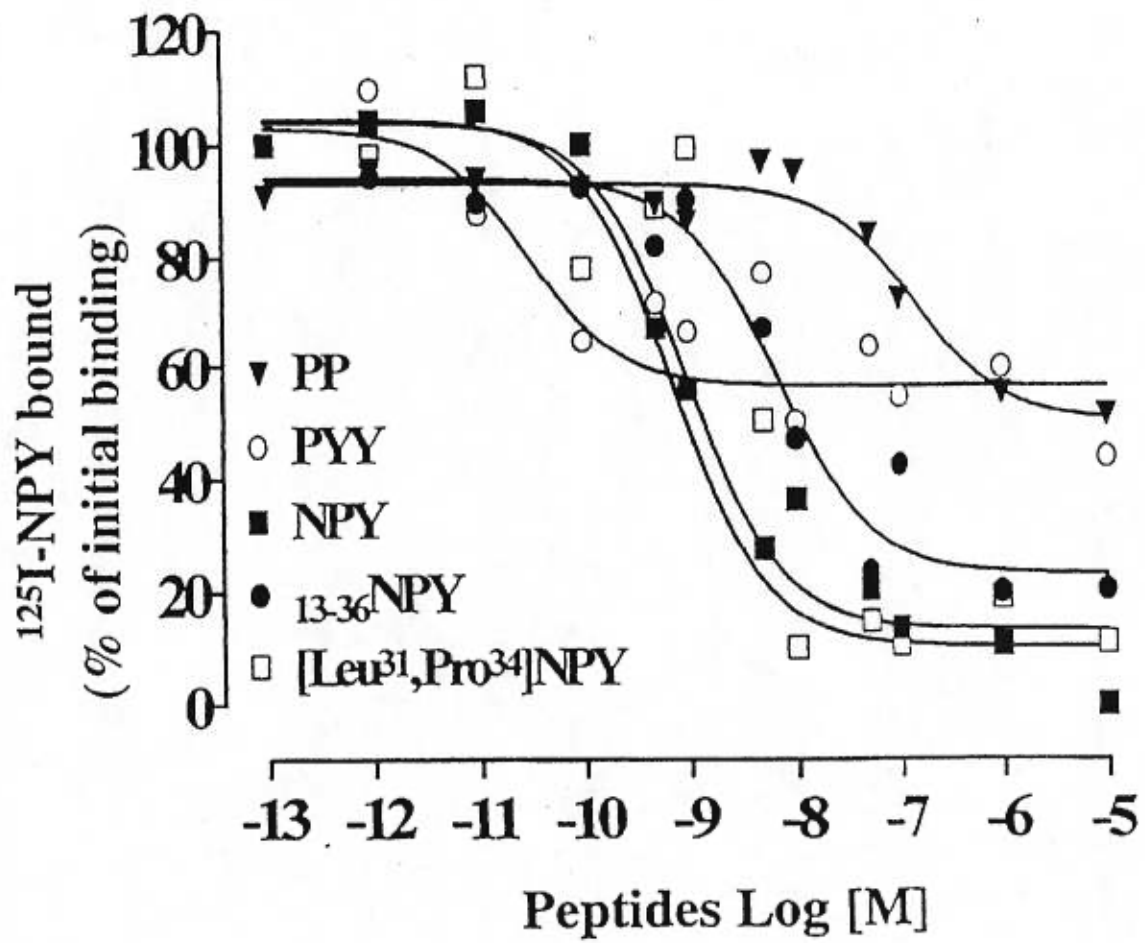


Fig 2

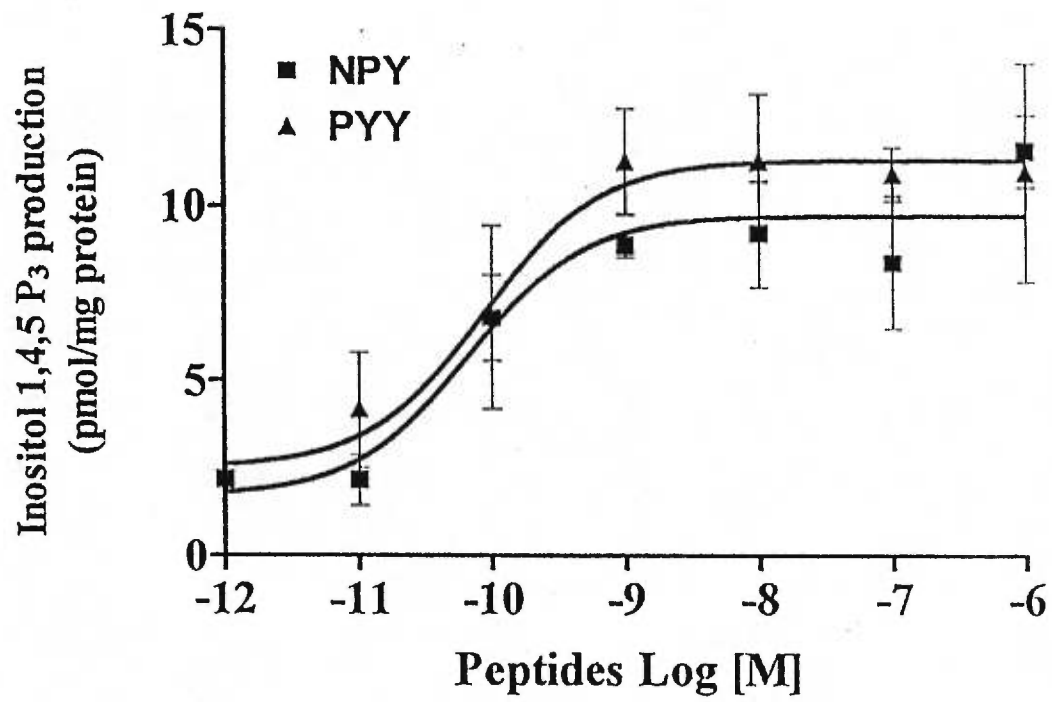


Fig 3

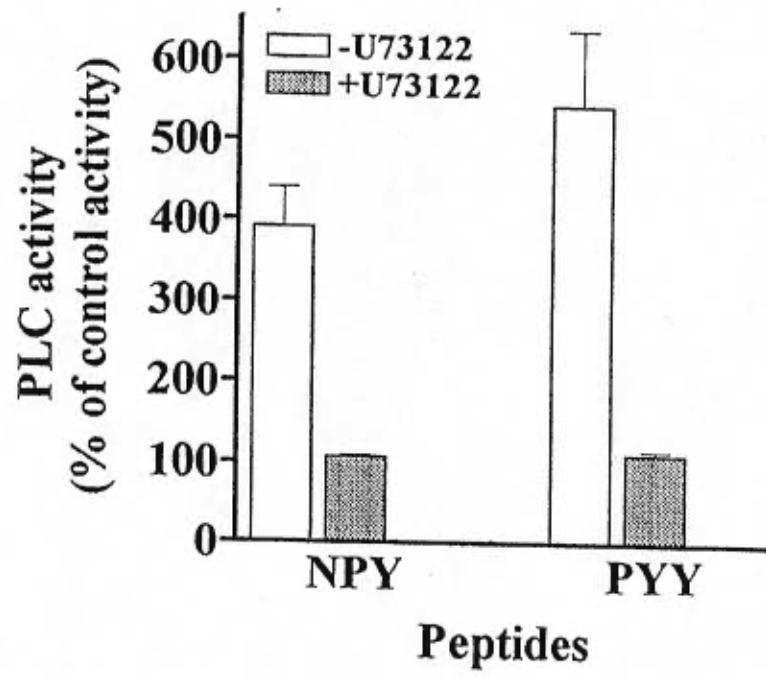


Fig 4

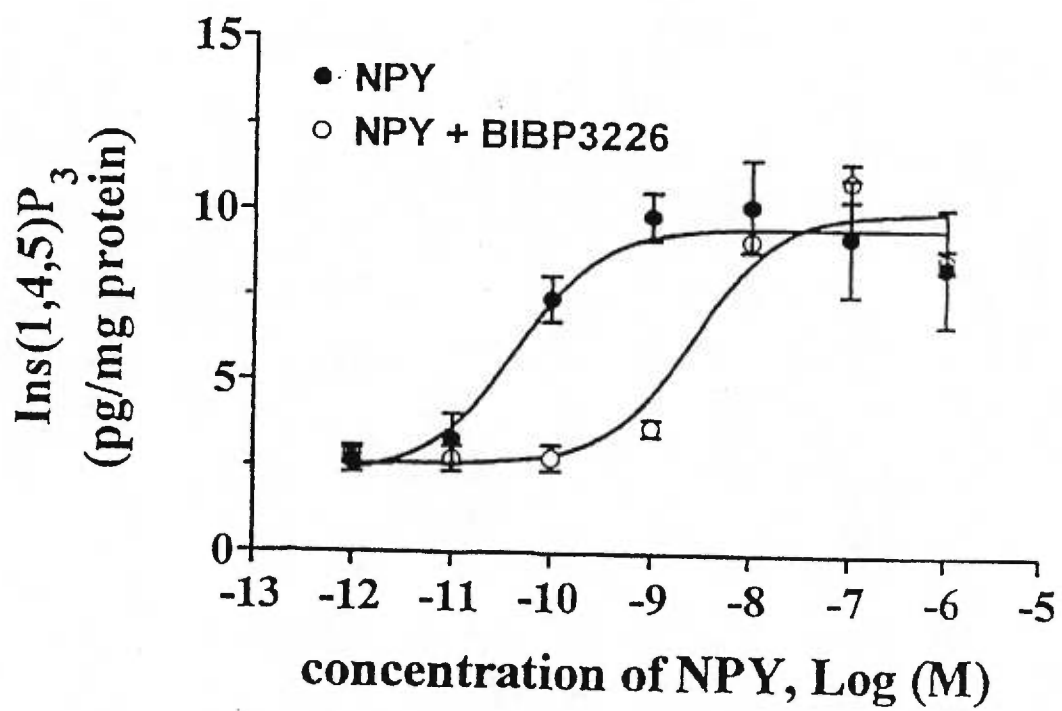


Fig 5

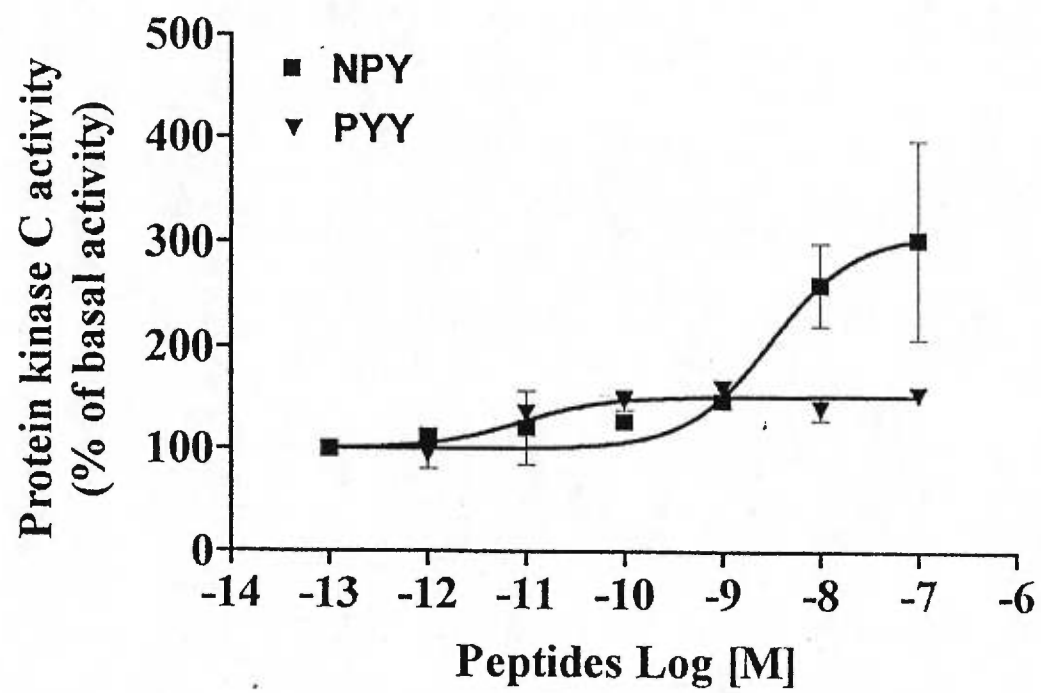


Fig 6

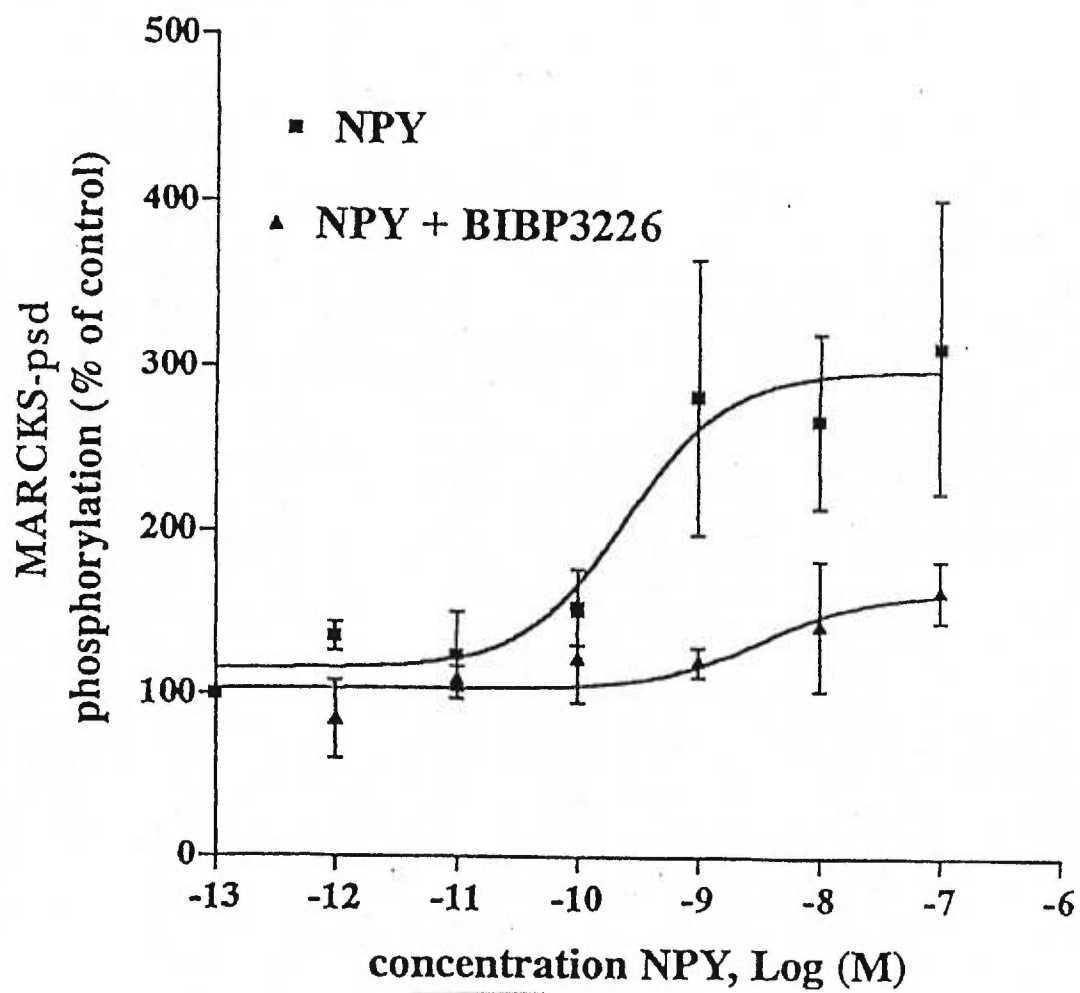


Fig 7

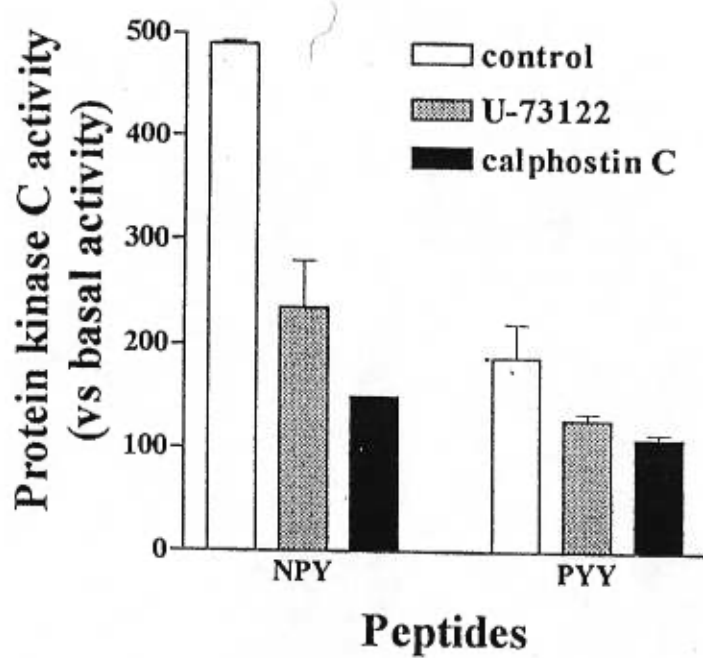


Fig 8

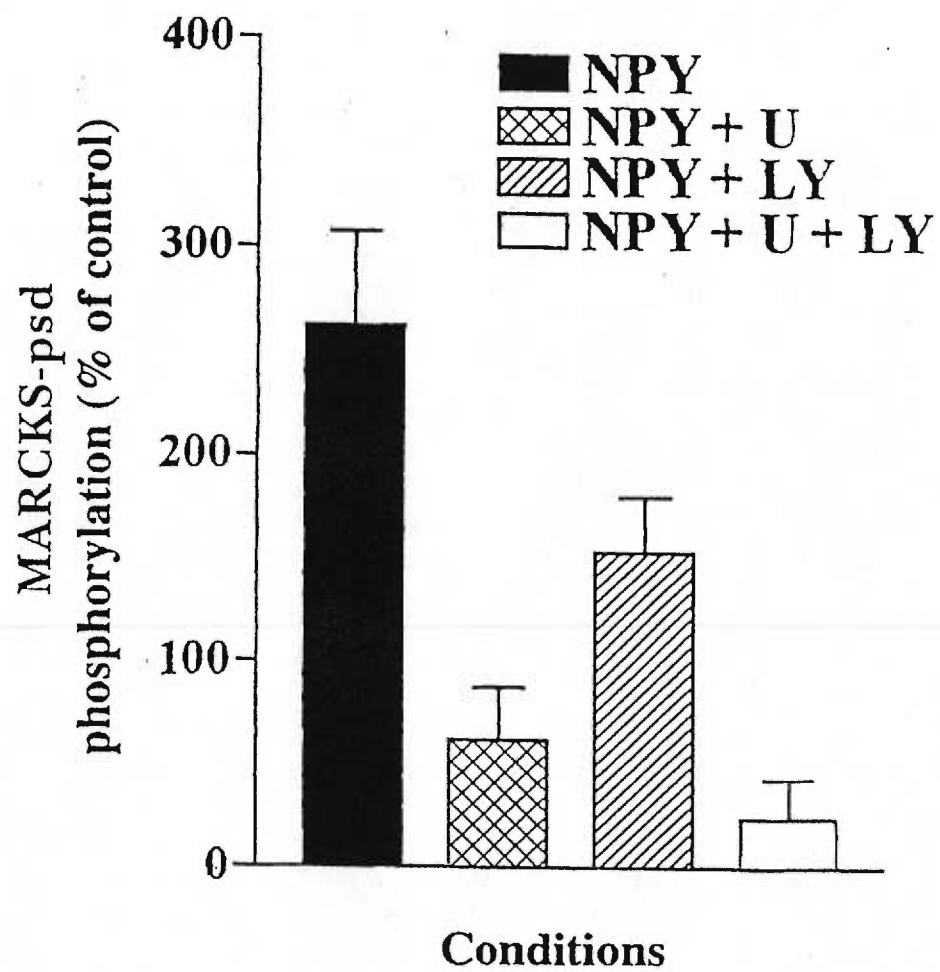


Fig 9

CHAPITRE QUATRIÈME
DEUXIÈME PAPIER

**ACTIVATION OF L-TYPE CALCIUM CHANNELS INDUCES
CORTICOTROPIN RELEASING FACTOR SECRETION FROM
HUMAN PLACENTAL TROPHOBLASTS**

Jacques Robidoux^{1,2}, Lucie Simoneau², André Masse¹ and Julie Lafond^{1,2,3}.

¹Programme des Sciences Biomédicales de la Faculté de Médecine, Université de Montréal et ²Laboratoire de Physiologie materno-fœtale, Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, Canada, H3C 3P8

Abbreviated title: L-type calcium channels and CRF release

³ Address all correspondence to:

Prof. Julie Lafond

Université du Québec à Montréal, Département des Sciences Biologiques.

C.P. 8888, Succursale "Centre-Ville", Montréal, Québec, (Canada), H3C 3P8

Fax: (514) 987-4647; E-mail: lafond.julie@uqam.ca

Tel: (514) 987-3000, Ext: 7857

Revised manuscript 992071, submitted to J Clin Endocrinol Metab (2000, May 12th)

Abstract

The ultimate outcome of pregnancy, parturition, is a well orchestrated process in which placental corticotropin-releasing factor (CRF) seems to play an important role. The objective of the present study was to investigate the involvement of L-type calcium channels and calcium-dependent signaling in the depolarization-induced CRF release from human syncytiotrophoblast. The basal secretion of CRF by trophoblastic cells, isolated from human term placenta, was maximal following their functional differentiation, which was monitored by hCG measurements. On the fourth day of culture, the basal CRF secretion of the cells in serum-free medium was linear between 2 and 8 h. Incubation of the trophoblasts with KCl, a depolarizing stimulus, or with Bay K8644, a L-type calcium channel agonist, for 3 or 8 h led to an increase in CRF secretion but was without effect on its synthesis. This stimulated CRF release occurred to be calcium-dependent since it could be prevented by loading cells with BAPTA-AM. Furthermore, the KCl-induced CRF secretion involved L-type calcium channels activation since 2 μ M nitrendipine, a L-type specific blocker, abolished the stimulation. In trophoblasts, where we have previously shown calcium-dependent protein kinase C (cPKCs) activity, incubation with Bay K8644 also stimulated calcium calmodulin kinase II (CaMKII) and extracellular regulated kinase (ERK_{1/2}) activities. In the present study, we observed that CaMKII and cPKCs were linked to the Bay K8644-induced secretion of the CRF since only the autocamtide-2 related inhibitory peptide (AIP), a CaMKII inhibitor, and Gö6976, an inhibitor of μ and cPKCs prevented partially (30-78%) the activation of CRF release by Bay K8644. The use of PD 098056, an inhibitor of the ERKs kinases, showed no effect on CRF release. Taken together, these results support a depolarization-induced and calcium-dependent exocytotic-like secretion of CRF from human placental trophoblasts. In addition, CaMKII and cPKCs seem to be potential modulators or mediators of these calcium effects on CRF secretion.

Introduction

The functional placental unit, which includes fetal membranes (amnion and chorion), plays an important role in the maintenance of pregnancy, the growth of the fetus, and in the timing of birth. This pivotal role of the placenta is largely accountable to its ability to produce a large variety of hormone, and to its intimate relationship with both fetal and maternal compartments (1). This gives the embryonic organ the opportunity to act in paracrine and endocrine manners on both fetal and maternal physiology throughout pregnancy (2).

The ultimate outcome of pregnancy, parturition, is only partially elucidated. Considering the plethora of hormones, growth factors and cytokines produced by the placental unit during spontaneous labor and delivery, this process appears to be well orchestrated (3). In the last few years, CRF, a 41-amino acid peptide component of the stress response in human, has emerged as a potent regulator of parturition, if not, one of the main coordinators of the placental clock controlling the duration of pregnancy and labor (4). In that regard, several studies indicated that maternal plasma concentration of CRF is elevated during pregnancy reaching its highest level at the onset of labor (5, 6), in particular during abnormal pregnancy complicated by preterm labor (7). Thus, since the outer layer of the chorionic villus, the placental syncytiotrophoblast appears to be, especially in the third trimester, the principal source of CRF during pregnancy (8, 9), it is of interest to characterize the mechanisms involved in the regulation of CRF release by this multicompetent endocrine structure.

In most cell types, protein kinase A (PKA) and PKCs are major positive regulators of preproCRF transcription and of CRF secretion (10-14). In addition, intracellular calcium and calcium influx *via* L-type calcium channels has been implicated in CRF release from hypothalamic cells (15, 16).

Three studies have shown that the membrane depolarization of placental trophoblasts increases CRF release (17-19). However, no study has until now explored directly the

implication of protein kinases in the modulation of CRF release by trophoblastic cells. Therefore we have investigated the role of L-type calcium channels in the depolarization-induced CRF synthesis and release in cultured trophoblastic cells. Additional aims of the present study were to investigate the contribution of CaMKII, cPKCs and ERK_{1/2} in the L-type calcium channels-dependent CRF secretion.

Materials and Methods

Placental trophoblast isolation and culture. Normal term placentas from either vaginal or caesarian delivery were obtained in accordance with the established guidelines of the ethical committee of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal. After delivery, the placentas were kept in 500 ml of cold (4 C) Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Life Technologies, Burlington, Canada) containing penicillin (200 U/ml), streptomycin (200 µg/ml), amphotericin B (5 µg/ml) and gentamycin (50 µg/ml) all from Sigma Chemical, St-Louis, Mo. The trophoblast cells were isolated as previously described by Thiede (20), following the modifications reported by Stromberg *et al* (21), and Winkel *et al* (22). Briefly, the villous tissue (~75 g) was grossly minced, rinsed in Hank's balance salt solutions (HBSS) (Life Technologies, Burlington, Canada) containing the additives mentioned above, and cut again into smaller pieces, before being rinsed in 100 ml HBSS without calcium and magnesium (HBSS*) on a rotary shaking incubator (50 rpm) for 10 min at 32 C. The rinsed tissue was after subjected to two consecutive digestions of 10 min in 120 ml of HBSS* containing 0.125 % trypsin (ICN, Montréal, Canada) and 0.02% deoxyribonuclease type I (Roche Molecular Biochemicals, Laval, Canada). Both supernatants were filtered over a succession of 200 µm and 60 µm sieves to remove aggregates. The digestion was stopped by the addition of 4% (v/v) of fetal calf serum (FCS) (Hyclone, Logan, Utah, USA). The cell suspension was centrifuged at 400 g for 10 min. The red blood cells were lysed in 140 mM ammonium chloride-TRIS-HCl buffer at 100 rpm for 15 min. The cells were then centrifuged at 350 g for 5 min, resuspended in HBSS, layered over a 10% percoll (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, Canada) and centrifuged at 450 g for 10 min. The resulting pellet was washed twice in HBSS and once in DMEM by centrifugation at 350 g for 5 min. The isolated trophoblast cells were suspended in DMEM containing FCS (10 %), fatty acid-free bovine serum albumin (BSA) (0.5%) (ICN), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml), amphotericin B (2.5µg/ml) and gentamycin (50µg/ml). After cells counting and evaluation of viability by trypan blue exclusion (viability usually greater than 90 %), the cells were plated at a density of 1.7×10^6 per well in 24 well plates (Sarstedt, Montréal, Canada). The cells were incubated in

a humidified atmosphere (95% air-5% CO₂ at 37 C). The culture medium was changed after the first 3 h and changed every day thereafter. All experiments were done at the fourth day of culture. On that day, the cell count was around 10⁶ per well, however inter-preparation variability was important. This variation is inherent to the methods and the model, but intra-preparation variability as judged by protein determination of cellular lysate was not more than 16 %.

Evaluation of trophoblast phenotype. Using the above isolation procedure, we commonly obtained cultures consisting of more than 90% trophoblast cells as judged by morphological and immunocytochemical determination of pan-cytokeratin-positive (epithelial cell marker; Sigma) and vimentin-positive cells (mesenchymal cell marker; Sigma) (23). Briefly, cells were grown for 12 h on plastic coverslips and were fixed for 10 min in acetone at -20 C. After evaporation, endogenous peroxidase activity was quenched by a 10 min incubation at 4 C with 3% H₂O₂ in methanol. Nonspecific binding was blocked by a 3 h incubation at room temperature with 5% skimmed milk, 3% FCS, and 1% BSA. Primary antibody was diluted (1:200 for vimentin, 1:400 for cytokeratin) in tris(hydroxymethyl)aminomethane buffered saline (TBS) containing 0.1% tween and incubated for 1 h. The biotinylated second antibody included in histochemical ABC kit (Oncogene Research, Cambridge, MA) was diluted in the same buffer and incubated for 1 h. An irrelevant antibody (trp E (Ab-1)), included in the kit, was used as first antibody for the control. All the following steps were done in accordance with the Oncogene's technical protocol, excepted that we also used the DAB enhancer from Sigma.

Measurements of human chorionic gonadotropin (hCG) release and CRF release by cultured trophoblasts. The levels of CRF and hCG release in the medium and in cells were determined respectively by RIA (Phoenix Pharmaceuticals) and ELISA (Medicorp) kits, following their respective protocols. The sensitivity of the CRF RIA kits was 24.2 ± 2.7 pg/tube while the sensitivity of the hCG ELISA kit was 75 mIU/ml. The inter-assay and within-assay variation coefficients was respectively 9.0 and 5.6 % at 16 pg/tube for CRF and 8 and 3.5 % at 50 mIU/ml for hCG. For the everyday follow-up of hormone release, the cells were cultured in serum-containing DMEM containing 0.5% (day 1 and

2) or 0.1% BSA (day 3 to 7). On the fourth day of culture, the content of CRF was determined in the absence (basal) and the presence of either KCl (40 mM) or Bay K8644 (5 μ M) for 3 and 8 h. For all experiments, the treated cells were compared to cells exposed to the appropriate vehicle(s). Before each experiment, cells were serum starved for 1 h in DMEM containing 0.1% BSA. After that, the medium was replaced by 200 μ l of medium containing the agent used as treatment. Ten min later, KCl or Bay K8644 (200 μ l) was added and incubated for the appropriate time. The medium present in each well was collected, centrifuged at 350 *g* for 5 min, evaporated to dryness before being stored at -20 C until assayed. For the intracellular CRF content, cells were lysed by the addition of 200 μ l of HBSS containing 0.1% Nonidet P-40, followed by a 5 sec sonication. The resulting medium was treated as described above.

Evaluation of the promotion of the autonomous form of CaMKII. The method used was essentially described by Abraham *et al* (24) with minor modifications. Briefly, cells were serum starved for 1 h in DMEM containing 0.1% BSA, then the medium was changed for fresh medium (200 μ l) and preincubated for 10 min. After that, Bay K8644 (200 μ l of a 10 μ M stock) was added and the cells were incubated for different interval of time. At the end of the incubation, the medium was aspired and replaced by 75 μ l of an ice cold lysis buffer constituted of an 1:1 mixture of calcium/magnesium-free HBSS and 50 mM 3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid (MOPS) buffer containing 1% Nonidet P-40, 20 mM sodium pyrophosphate, 4 mM dithiothreitol, 2 mM NaF, 2 mM EGTA, 1 mM ammonium molybdate, 200 μ M phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 20 μ M leupeptine and 1 μ g/ml aprotinin. Following a 5 seconds sonication, the protein content of the lysates (83.8 ± 10.0 μ g/well) was quantified by the BCA protein assay (Pierce, Rockford, IL). The autonomous CaMKII activity of the lysate was assayed by incubating 5 μ g of the lysate in a total 25 μ l mixture containing 50 μ M autocamtide-2 and 10 μ M [γ - 32 P]ATP in 10 mM MOPS (pH 7.4) containing 10 mM magnesium chloride and 1 mM EGTA, at room temperature for 5 minutes. The reaction was stopped by the addition of 150 μ l of ice cold 10% trichloroacetic acid. Samples were incubated for 30 minutes at 4 C and centrifuged at 10 000 *g* for 3 min. After that, 150 μ l of the

supernatant were added to an equal volume of 30% trichloroacetic acid before being adsorbed to MultiScreen phosphocellulose plates (Millipore, Nepean, Ontario, Canada). An aliquot (150 μ l) of the supernatant was added to an equal volume of 30% trichloroacetic acid and the mixture was adsorbed on a MultiScreen phosphocellulose plates (Millipore, Nepean, Canada). Following three washes, the filters were punched into vials and counted using a liquid scintillation β counter after addition of 5 ml of Ready protein+ liquid scintillation cocktail (Beckman Canada, Mississauga, Canada). The specific incorporation into the synthetic peptide was determined as the difference in its presence and its absence.

Evaluation of the ERK_{1/2} activation. The evaluation of ERK_{1/2} activation was done by Western blot using an anti-phosphoERK_{1/2} antibody purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Briefly, cells were serum-starved for 3 h, preincubated for 10 min in 200 μ l fresh serum-free medium and in the presence of 5 μ M Bay K8644 for different interval of time. At the end of the incubation, the medium was aspirated and replaced by 75 μ l of SDS loading buffer containing 80 μ M sodium vanadate, 80 μ M sodium pyrophosphate, 10 mM EDTA, 0.8 mg/ml benzamidine, 80 μ M PMSF, 0.8 μ g/ml pepstatin, and 0.4 μ g/ml aprotinin. The protein content of the lysates (75.0 ± 11.9 μ g/well) was quantified by a modification of the Bradford method (25). Proteins (10 μ g) were loaded on an alkaline tricine-SDS-PAGE system consisting of a 4 % stacking gel and a 12 % acrylamide-glycerol separating gel (26), using a Mini-Protean II system (Bio-Rad, Hercules, CA). After migration, proteins were transferred to PVDF membrane (Roche Molecular Biochemicals, Laval, Canada) using a semi-dry system (Millipore, Nepean, Canada). The membrane was blocked overnight at 4 C in Tris-buffered saline containing 0.05 % tween (TBS-T), 5% skimmed milk, 3% FCS, and 1% BSA. These membranes were blotted for 1 h at room temperature with the anti-phosphoERK_{1/2} antibody (1:1000 in TBS-T), washed three times with TBS-T, and incubated for 1 h in TBS-T containing 0.5% skimmed milk, 0.3% FBS, and 0.1% BSA and a horseradish peroxidase-coupled anti-rabbit IgG antibody (1:1250) (Roche Molecular Biochemicals,

Laval, Canada). Finally, the immunoreactive bands were developed by chemiluminescent (Roche Molecular Biochemicals, Laval, Canada). The specific bands were quantified by densitometric scanning of the X-ray film using the Personal Densitometer (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) and analyzed with ImageQuant software (Sunnyvale, CA).

For each cell preparation ($n = 3$, unless otherwise stated), experiments were done in duplicate or triplicate at a given condition or time point. The mean of such replicates was used as a single datum point for analysis. When time-course protocols were analyzed, ANOVA on repeated measures followed by Dunnett's post-hoc test were used. Otherwise Newman-Keuls test was used to compare multiple condition experiments.

Results

Characterization of the basal CRF release by human placental trophoblasts in culture.

In order to determine if the cells preparations display CRF-secretion competence, the basal 24 h secretion of CRF was followed over a period of 7 days. As shown in Fig. 1, the basal CRF secretion by freshly isolated trophoblasts was modest over the first 48 h of culture. We observed a sustained peak on day 3 and 4, followed by a progressive decline to reach the initial level of secretion by the sixth day. In order to determine if this increase of CRF secretion could be correlated with trophoblasts differentiation into functional syncytiotrophoblast, we measured the production of hCG, an accepted marker of this differentiated state (27). As shown in Fig. 1, the CRF release correlated with the hCG production. This increase of both peptides secretions could not be attributed to cellular proliferation, since the trophoblastic cells did not incorporate thymidine significantly during the three hours incubation performed 24 h after plating, and their nuclei and protein contents both declined by ~10% daily (data not shown). Since the cells were fully competent to produce CRF on day 3 to 4 of culture, the subsequent experiments were all performed on the fourth day.

We further characterized the basal CRF release over a 24 h incubation period of the cells in serum-free DMEM. Figure 2 shows an initial rapid CRF accumulation in the medium upon the first 2 h of incubation, followed by a modest, but linear accumulation for the subsequent 6 h of incubation. The CRF accumulation in the medium seems to reach a plateau after 24 hours. Therefore, the subsequent experiment were conducted at 3 h (where CRF is in convenient amount to be detected by the RIA kit) and at 8 h (still in the linear portion of the basal CRF release and enough to detect synthesis). The intracellular CRF content was not significantly different over the 24 h incubation period, which means that the cells were not depleted over time, even without the serum (data not shown) and that a constitutive basal synthesis and release of CRF was present.

Regulation of CRF secretion following cell depolarization or L-type calcium channels activation. Potassium chloride-induced CRF secretion has been previously described in

placental explants and cells (17-19). In the present study, we wanted to establish that calcium influx was responsible for the KCl-induced CRF release, and investigate the nature of the channels responsible for this calcium entry into the trophoblastic cells. Potassium chloride (40 mM) increases the amount of CRF released in the medium by 70 % after 3 or 8 h ($P < 0.05$; Fig. 3a and 3c). Meanwhile, the total cellular CRF content (determined by adding released CRF and intracellular content of the peptide) was not modified following the KCl treatments (Fig. 3b and 3d). To ensure that the KCl-induced CRF release was a calcium-dependent effect, we loaded the cells for 30 min with 20 μ M BAPTA/AM, an intracellular calcium chelator. As shown in Fig. 3a and 3c, BAPTA totally prevented the KCl-induced CRF release, but did not have any effect on the basal CRF release. Since the KCl effect most likely involves voltage-gated calcium channels, and the presence of L-type calcium channels has been reported in syncytiotrophoblast (28), we investigated the involvement of L-type calcium channels in the KCl effect on the CRF release. Nitrendipine (2 μ M), a L-type specific blocker, prevented the KCl-induced CRF release, but had no effect on the basal release of the peptide (Fig. 3a and 3c). Furthermore, incubation of the cells with Bay K8644 (5 μ M)(an L-type calcium channels agonist) elicited also a stimulation of CRF secretion, rising the CRF released by 80% after 3 h ($P < 0.05$; Fig. 4a) and 70% after 8 h ($P < 0.01$; Fig. 4c). Incubations of the cells with Bay K8644 was also without any effect on CRF synthesis (Fig. 4b and 4d). As expected, preincubation with either BAPTA/AM or nitrendipine completely prevented the rise of CRF release induced by Bay K8644 (Fig. 4a and 4c).

Activation of CaMKII and ERK_{1/2} in response to L-type calcium channels activation. We investigated the activation of both CaMKII and ERK_{1/2} by Bay K8644 in order to ascertain their involvement in the signal transduction pathways connecting L-type calcium channels to CRF release.

CaMKII is characterized by an activation-dependent autophosphorylation leading to the promotion of a calcium/calmodulin independent activity (29). A time-course experiment was conducted to evaluate the induction of the autonomous form of the kinase in the presence of Bay K8644 (5 μ M). As shown in Fig. 5, the presence of Bay K8644 induces

a slow but important promotion of the autonomous form of CaMKII, which reached a maximum after 120 sec (1.24 ± 0.20 pg/min/mg of protein vs 0.58 ± 0.25 ; $P < 0.05$), and thereafter gradually returned to the basal level.

ERK_{1/2} are catalytically activated by phosphorylation (30), which can be monitored by Western blot using a phosphoERK_{1/2} antibody. A time-course experiment was conducted to evaluate the induction of the phosphorylated form of the kinases in presence of Bay K8644 (5 μ M). As shown in Fig 6, incubation of the cells with Bay K8644 led to a biphasic ERK_{1/2} activation. A first peak of activation was obtained after 7.5 min ($P < 0.01$), followed by a sustained activation phase from 30 min to 3 h. In contrast, the medium alone has no effect on ERK_{1/2} activity (not shown).

Effect of protein kinase inhibitors on Bay K8644-induced CRF release. We evaluated the involvement of CaMKII and ERKs activation in Bay K8644-induced CRF release. Furthermore, since we recently reported the presence of cPKCs activity in syncytiotrophoblast (31), we also investigated the involvement of cPKCs in Bay K8644-induced CRF release. Cells were incubated in the presence of well defined inhibitors of these kinase families. As shown in Fig. 7a and 7c, incubation of the cells with Gö6976 (1 μ M), a specific inhibitor of the conventional (calcium-dependent) and μ PKCs (32, 33), prevented most (50% at 3 h and 80% at 8 h) of the Bay K8644 effect on CRF release. Our results also showed that CaMKII, another calcium-dependent kinase, appears to be linked to this CRF release, since the presence of AIP (1 μ M), a specific inhibitor of this kinase (34), partially blocked (50%) the Bay K8644-induced CRF release for both incubation times (Fig. 7a and 7c). However, incubation of the cells with PD 098056 (40 μ M), an ERKs kinases inhibitor (35), was without effect on Bay K8644-induced CRF release at both incubation times (Fig. 7a and 7c). Finally, neither of these inhibitors has any effect on basal CRF synthesis or release (Fig. 7a, 7b, 7c and 7d).

Discussion

Peptide secretion by endocrine cells occurs at least by two distinct pathways, described as the constitutive and regulated pathways by Kelly (36). In the latter, peptides are packaged and stored in moderate and high density secretory granules, which are released in response to the appropriate external stimuli (37). Peptides conveyed by the constitutive secretory pathway, are packaged into secretory vesicles of low density and are released at a constant rate at the cell surface (37). Calcium is the central second messenger in the regulated peptide release, and has been suggested to play a role in exocytosis by binding directly, or *via* its complexation to calmodulin, to cytoskeletal elements, granule proteins, calcium-dependent kinases or calcium/calmodulin-dependent kinases. In syncytiotrophoblast, electron microscopic studies have showed the existence of light and dense granules which emerge from Golgi apparatus and seem to travel through the cytoplasm until they reach the brush border plasma membrane, where they fuse in an exocytotic fashion (38,39). Little is known regarding the pathways of the CRF secretion in syncytiotrophoblast, and there is no ultrastructural study addressing vesicular localization of CRF.

Since studies performed on placental explants as well as placental cells have suggested the existence of calcium-dependent CRF secretion (17-19), the present study was designed to ascertain the role of L-type calcium channels and subsequent calcium-dependent signaling on CRF synthesis and release by human trophoblastic cells. The results presented show that L-type calcium channels appear to be the sole route for calcium entry following a depolarizing stimuli. The results also demonstrate, for the first time, that a calcium influx through L-type calcium channels promotes the activation of both CaMKII and ERKs in trophoblastic cells, and that the former effect is partly responsible for the associated increase in CRF release. In addition CRF release following L-type calcium channels activation also implicates cPKCs.

First, we established the competence of our cells preparations in secreting CRF. Our results clearly showed that cytotrophoblasts freshly isolated from human term placenta

secreted a low level of CRF. A parallelism was observed in their acquisition of CRF- and hCG-secreting competencies, two markers of functional differentiation into syncytiotrophoblast, reaching maximal values on the fourth day of culture. These results are in agreement with a previous study that reported an undetectable level of CRF in freshly isolated cytotrophoblasts (19), and correlate with the absence of immunohistochemical staining in cytotrophoblasts for third trimester placentas (9). The observed peak after 3 days of culture, is also in agreement with the CRF immunohistochemical staining in intermediate trophoblasts and in the syncytiotrophoblast layer from third trimester placentas (9), and correlate with the peak in placental cells CRF production on the third day reported by Ni *et al* (19). The explanation of the following decrease in both peptides secretion on day 5 and 6 is less obvious, but has been observed previously for hCG after 4-5 days of culture (40,41).

Our study agrees with one study done on placental explants (17) and two studies done in the Smith laboratory on placental cells (18, 19) that reported that KCl induces a marked increase in CRF release, which suggest depolarization-induced calcium-dependent CRF release by the syncytiotrophoblast. Furthermore, the present results showed that the KCl stimulation of CRF release from syncytiotrophoblast during both 3 and 8 h incubation times was indeed calcium-dependent and mediated *via* an L-type calcium channels activation, since BAPTA/AM and nitrendipine abolished this stimulation. Moreover, direct activation of L-type calcium channels by Bay K8644 mimicked the KCl-induced CRF release, which further substantiates the role of these channels in the regulation of this peptide release by trophoblastic cells. The current results are in agreement with the presence of L-type calcium channels in human placenta (28), as well as L-type calcium channels-dependent secretion process (28, 42-44). In the other hand, the important depolarization that should accompany the use of high KCl concentration make it unlikely that the T-type calcium channels which are also expressed in the placenta (45), play any significant role in the KCl-induced increase in the CRF release. Interestingly, the presence of BAPTA alone, which should induce a calcium influx (46), is not enough by itself to induce the release of CRF, which suggests that the route of calcium influx is an important determinant of CRF release. In addition, the absence of effect of

nitrendipine on basal CRF release either means that there is a low spontaneous activity of the channels or that threshold level of calcium in the vicinity of the secretory apparatus is not reached.

We provide the first evidence for the promotion of the autonomous form of CaMKII following activation of L-type calcium channels by Bay K8644 in syncytiotrophoblast. This kinase activation was surprisingly slow and transient. While the mechanism involved in this slow kinetic was not explored, it could be possible that the microvillous nature of the apical route of calcium entry being rich in F-actin could constitute an effective calcium buffer that will slow-down diffusion of the divalent cation from the entrance to a CaMKII located deeper in the cytoplasm (47). Nevertheless it seems rapidly desensitized, since despite continuous channels stimulation, CaMKII activity returns to its basal level by 180 seconds. In that respect, it is possible that the lowering of the activity during sustained calcium elevation arise from autophosphorylation on serine³¹⁴ which has been correlated with the loss of autonomy in hippocampal pyramidal neurons (48). An alternative hypothesis is that the sustained rise in intracellular calcium has activated a phosphatase which in turn has dephosphorylated the threonine²⁸⁶ and terminated the autonomous activity (49,50).

We also showed for the first time a modest, but sustained activation of ERK_{1/2} following the activation of L-type calcium channels by Bay K8644 in trophoblastic cells. Although the exact mechanism of that activation was beyond the scope of the present study, it appears that stimuli that can lead to sustained calcium entry can also lead to sustained ERK_{1/2} activity. In the present context, we can speculate that ERK_{1/2} activation could result from either a calcium-, calcium/calmodulin-, CaMKII or cPKCs-dependent activation. In that respect, calcium-dependent and cPKCs activation of the cytosolic tyrosine kinase pp125FAK or PYK2, which in turn initiate the formation of a Src-Grb2-Sos complex, leading to the activation of the Ras/Raf/MEK_{1/2}/ERK_{1/2} cascade have been described (51,52). Raf has also been shown to be phosphorylated and activated by cPKCs. The activated Raf, in turn leads to the phosphorylation and activation of MEK_{1/2}, which are the principal ERK_{1/2} kinases (53). CaMKII has also been proposed to be implicated in

ERK_{1/2} activation, an effect that appears to be upstream from MEK_{1/2} (54). Finally a calcium-dependent transactivation of the epidermal growth factor receptor has been proposed to mediate ERK_{1/2} *via* the Grb2-Sos/Ras/Raf/MEK_{1/2} cascade (55).

Previous reports have shown that PKCs activation by phorbol ester stimulates CRF release in perfused hypothalami (10) or in dispersed hypothalamic cells (56). The present study shows that PKCs are implicated in CRF release from human placental cells, since our results showed that an inhibition of μ and cPKCs decreased markedly CRF release. It is unlikely that inhibition of μ subtype of PKC has any implication following L-type calcium channels activation, since they do not have calcium binding domain (57). However, cPKCs are responsive to calcium, and are present in syncytiotrophoblast (29, 58, 59), thus it is more plausible that these kinases, repetitively implicated in secretion process (60) are indeed part of the mechanisms leading to CRF release in syncytiotrophoblast. Clearly, there are many potential targets for cPKCs in the secretory apparatus, which include cytoskeletal, as well as proteins known to be implicated in the last steps of exocytosis. However, we can not exclude the possibility that the effect of the PKC inhibitor could be the result of a cross-talk between cPKCs and either L-type calcium channels or CaMKII. Concerning L-type calcium channels, Fomina and Levitan have described a positive control on L-type calcium channels responsiveness by PKCs basal activity (61). In CaMKII regard, PKCs are known to phosphorylate many cytoskeletal elements, which release calmodulin, which in turn becomes available to activate CaMKII (62). Nevertheless even if the exact mechanism(s) involved is(are) not clearly defined, our results give an evidence of an important implication of cPKCs as a CRF release modulator.

CaMKII is ubiquitous and considerable experimental evidences suggest an implication of the enzyme in peptide hormone secretion (63, 64). The effect of AIP on CRF secretion, clearly showed the involvement of CaMKII in the induction of CRF release following L-type calcium channels activation. The exact nature of the substrates involved in the CaMKII action on CRF release is still unclear, but in mouse pancreatic B-cells, the kinase is involved at early steps of the exocytotic machinery leading to

insulin release (63). The ERK_{1/2} activation by Bay K8644 leads us to investigate its possible role in CRF release. But as with pancreatic β cells, where glucose leads to ERK_{1/2} activation but not to ERK_{1/2}-dependent insulin release (65), we could not substantiate ERK_{1/2} involvement in CRF release by syncytiotrophoblast.

In summary, our data showed that activation of voltage-operated calcium channels directly or by a depolarizing stimulus, induces CRF release from syncytiotrophoblast. The calcium influx *via* these channels can lead to the activation of both CaMKII and ERKs in trophoblastic cells, and the former effect is partly responsible for the associated increase of CRF release. In addition CRF release following L-type calcium channels activation also implicates cPKCs. Actually, it is not clear whether these *ex-vivo* observations are any reflective of the *in vivo* situations, but they conclusively showed that calcium is effective to induce CRF release, and that other stimuli leading to cPKCs and CaMKII activation could also be potent CRF secretagogues.

Acknowledgements

We express our gratitude to Mrs Christiane Paré (Chief of Nursing) and the staff of the Department of Obstetrics and Gynecology of Pavillon St-Luc of the Centre Hospitalier Universitaire de Montréal (CHUM) for the donation of placentas. We are also grateful to Dr. Robert Moreau and Mélanie Laramée for valuable criticism of the paper. This study was supported by grants from Université du Québec à Montréal (Prof. J. Lafond). J. Robidoux was the recipient of a FRSQ-FCAR santé doctoral studentship.

References

1. **Evain-Brion D** 1999 Maternal endocrine adaptations to placental hormones in humans. *Acta Paediatr Suppl* 428:12-16
2. **Petraglia F, Florio P, Nappi C, Genazzani AR** 1996 Peptide signaling in human placenta and membranes: autocrine, paracrine, and endocrine mechanisms. *Endocr Rev* 17:156-186
3. **Olson D, Mijovic J, Sadowsky D** 1995 Control of parturition. *Seminars in Perinatology* 19:52-63
4. **McLean M, Bisit A, Davies J, Woods R, Lowry PJ, Smith R** 1995 A placental clock controlling the length of human pregnancy. *Nat Med* 1:460-463
5. **Goland RS, Waedlaw SL, Stark RI, Brown LS, Frantz AG** 1986 High levels of corticotropin-releasing hormone immunoreactivity in maternal and fetal plasma during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 63:1199-1204
6. **Campbell EA, Linton EA, Wolfe CDA, Scraggs PR, Jones MT, Lowry PJ** 1987 Corticotropin-releasing hormone concentrations during pregnancy and parturition. *J Clin Endocrinol Metab* 64:1054-1059
7. **Warren WB, Patrick SL, Goland RS** 1992 Elevated maternal plasma corticotropin-releasing hormone levels in pregnancies complicated by preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 166:1198-1202
8. **Riley SC, Challis JRG** 1991 Corticotrophin-releasing hormone production by the placenta and fetal membranes. *Placenta* 12:105-119

9. **Riley SC, Walton JC, Herlick JM, Challis JRG** 1991 The localization and distribution of corticotropin-releasing hormone in the human placenta and fetal membranes throughout gestation. *J Clin Endocrinol Metab* 72:1001-1007
10. **Suda T, Yajima F, Tomori N, Demura H, Shizume K** 1985 *In vitro* study of immunoreactive corticotropin-releasing factor release from the rat hypothalamus. *Life Sci* 37:1499-1505
11. **Adler GK, Smas CM, Fiandaca M, Frim DM, Majzoub JA** 1990 Regulated expression of the human corticotropin-releasing hormone gene by cyclic AMP. *Mol Cell Endocrinol* 70: 165-174
12. **Emanuel RL, Girard DM, Thull DL, Majzoub JA** 1990 Second messengers involved in the regulation of corticotropin-releasing hormone mRNA and peptide in cultured rat fetal hypothalamic primary cultures. *Endocrinology* 126:3016-3021
13. **Parkes DG, Yamamoto GY, Vaughan JM, Vale W** 1993 Characterization and regulation of corticotropin-releasing factor in the human hepatoma NPLC-KC cell line. *Neuroendocrinology* 57:663-669
14. **Van LV** 1993 Phorbol ester stimulates the activity of human corticotropin-releasing hormone gene promoter via 3',5'-cyclic adenosine monophosphate response element in transiently transfected chicken macrophage. *Endocrinology* 132:30-34
15. **Tsagarakis S, Rees LH, Besser GM, Grossman A** 1991 Involvement of calmodulin in depolarization-induced release of corticotropin-releasing hormone-41 from rat hypothalamus *in vitro*. *J Mol Endocrinol* 7:71-75
16. **Gabr RW, Gladfelter WE, Birkle DL, Azzaro AJ** 1994 *In vivo* microdialysis of corticotropin-releasing factor (CRF): calcium dependence of depolarization-induced neurosecretion of CRF. *Neurosci Lett* 169:63-67

17. **Thomson M, Chan EC, Falconer J, Madsen G, Smith R** 1988 Secretion of corticotropin-releasing hormone by superfused human placental fragments. *Gynecol Endocrinol* 2:87-100
18. **Sun K, Smith R, Robinson PJ** 1994 Basal and KCl-stimulated corticotropin-releasing hormone release from placental syncytiotrophoblasts is inhibited by sodium nitroprusside. *J Clin Endocrinol Metab* 79:519-524
19. **Ni X, Chan EG, Fitter JT, Smith R** 1997 Nitric oxide inhibits corticotropin-releasing hormone exocytosis but not synthesis by cultured human trophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 82:4171-4175
20. **Thiede HA** 1960 Studies of the human trophoblast in tissue culture. I. Cultural methods and histochemical staining. *Am J Obstet Gynecol* 79: 636-647
21. **Stromberg K, Azizkhan JC, Speeg KV** 1978 Isolation of functional human trophoblast cells and their partial characterization in primary culture. *In Vitro* 14:631-638
22. **Winkel CA, Smyder JM, Macdonald PC, Simpson ER** 1980 Regulation of cholesterol and progesterone synthesis in human placental cells in culture by serum lipoproteins. *Endocrinology* 106:1054-1060
23. **Contractor SF, Routledge A, Sooranna SR** 1984 Identification and estimation of cell types in mixed primary cell cultures of early and term human placenta. *Placenta* 3:41-54
24. **Abraham ST, Bencotter H, Schworer CM, Singer HA** 1996 *In situ* Ca^{2+} dependence for activation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 271:2506-2513

25. **Pande SV, Murthy MSR** 1994 A modified micro-Bradford procedure for elimination of interference from sodium dodecyl sulfate, other detergents, and lipids. *Anal Biochem* 220:424-426
26. **Schägger H, von Jagow G** 1987 Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166:368-379
27. **Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM, Strauss JF** 1986 Purification, characterization, and *in vitro* differentiation of cytotrophoblasts from human term placenta. *Endocrinology* 118:1567-1582
28. **Cimerikic B, Zamah R, Ahmed MS** 1998 Identification of L-type calcium channels associated with kappa opioid receptors in human placenta. *J Mol Neurosci* 10:261-272
29. **Hanson PI, Schulman H** 1992 Neuronal Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinases. *Annu Rev Biochem* 61:559-601
30. **Cobb HM, Goldsmith EJ** 1995 How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem* 270:14843-14846
31. **Amane A, Simoneau L, Savard R, Lafond J** 1995 Identification and chromatographic separation of protein kinase C isotypes in syncytiotrophoblast brush border and basal plasma membranes of human placenta. *Int J Biol Chromatography* 1:237-246
32. **Martiny-Baron G, Kazanietz MG, Mischak H, Blumberg PM, Kochs G, Hug H, Marmé D, Schächtele C** 1993 Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indocarbazole Gö 6976. *J Biol Chem* 268:9194-9197

33. **Gschwendt M, Dieterich S, Rennecke J, Kittstein W, Mueller HJ, Johannes FJ** 1996 Inhibition of protein kinase C μ by various inhibitors. Differentiation from protein kinase C isoenzymes. *FEBS Lett* 392:77-80
34. **Ishida A, Kameshita I, Okuno S, Kitani T, Fujisawa H** 1995 A novel highly specific and potent inhibitor of the calcium-dependent protein kinase II. *Biochem Biophys Res Comm* 212:806-812
35. **Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR** 1995 PD 098056 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem* 270:27489-27494
36. **Kelly RB** 1985 Pathways of protein secretion in eukaryotes. *Science* 230:25-32
37. **Burgess TL, Kelly RB** 1987 Constitutive and regulated secretion of proteins. *Ann Rev Cell Biol* 3:243-293
38. **Drachenberg CB, Papadimitriou JC** 1992 Endocrine secretory granules and crystals in the syncytiotrophoblast. *J Submicrosc Cytol Pathol* 24:123-127
39. **Fujimoto S, Hamasaki K, Ueda H, Kagawa H** 1986 Immunoelectron microscope observations on secretion of human placental lactogen (hPL) in the human chorionic villi. *Anat Rec* 216:68-72
40. **Kato Y, Braunstein GD** 1989 Discordant secretion of placental protein hormones in differentiating trophoblasts *in vitro*. *J Clin Endocrinol Metab* 68 :814-820
41. **Morrish DW, Bhardwaj D, Dabbagh LK, Marusyk H, Siy O** 1987 Epidermal growth factor induces differentiation and secretion of chorionic gonadotropin and placental lactogen in normal human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 65:1282-1290

42. **Petraglia F, Lim ATW, Vale W** 1987 Adenosine 3',5'-monophosphate, prostaglandins, and epinephrine stimulate the secretion of immunoreactive gonadotropin-releasing hormone from cultured human placental cells. *J Clin Endocrinol Metab* 65:1020-1025
43. **Shi CZ, Zhuang LZ** 1993 Norepinephrine regulates human chorionic gonadotrophin production by first trimester trophoblast tissue *in vitro*. *Placenta* 14:683-693
44. **Petit A, Gallo-Payet N, Vaillancourt C, Bellabarba D, Lehoux JG, Belisle S** 1993 A role for extracellular calcium in the regulation of placental lactogen release by angiotensin-II and dopamine in human term trophoblastic cells. *J Clin Endocrinol Metab* 77:670-676
45. **Cribbs LL, Lee JH, Yang J, Satin J, Zhang Y, Daud A, Barclay J, Williamson MP, Fox M, Rees M, Perez-Reyes E** 1998 Cloning and characterization of $\alpha 1H$ from human heart, a member of the T-type Ca^{2+} channel gene family. *Circ Res* 83:103-109
46. **Parekh AB, Penner R** 1997 Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev* 77:901-930
47. **Lange K** 1998 Microvillar Ca^{2+} signalling: a new view of an old problem. *J Cell Physiol* 180:19-34
48. **Scholz WK, Palfrey HC** 1998 Activation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II by extracellular calcium in cultured neurons. *J Neurochem* 71:580-591

49. **Starck S, Barban MA, Wadzinski BE, Colbran RJ** 1997 Differential inactivation of postsynaptic density-associated and soluble Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II by protein phosphatase 1 and 2a. *J Neurochem* 68:2119-2128
50. **Kitani T, Ishida A, Okuno S, Takeuchi M, Kameshita I, Fujisawa H** 1999 Molecular cloning of Ca^{2+} /Calmodulin-dependent protein kinase phosphatase. *J Biochem* 125:1022-1028
51. **Lev S, Moreno H, Martinez R, Canoll P, Peles E, Musacchio JM, Plowman GD, Rudy B, Schlessinger J** 1995 Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca^{2+} -induced regulation of ion channel and MAP kinase function. *Nature* 376:737-745
52. **Blaukat A, Ivankovic-Didik I, Grönroos E, Dolfi F, Tokiwa G, Vuori K, Dikic I** 1999 Adaptator proteins Grb2 and Crk couple Pyk2 with activation of specific mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem* 274:14893-14901
53. **Schönwasser DC, Marais RM, Marshall CJ, Parker PJ** 1998 Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isoforms. *Mol Cell Biol* 18:790-798
54. **Muthalif MM, Benter IF, Uddin MR, Malik KU** 1996 Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II α mediates the activation of mitogen-activated protein kinase and cytosolic phospholipase A₂ in norepinephrine-induced arachidonic acid release in rabbit aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 271:30149-30157
55. **Eguchi S, Numaguchi K, Iwasaki H, Matsumoto T, Yamakawa T, Utsunomiya T, Motley ED, Kawakatsu H, Owada KM, Hirata Y, Marumo F, Inagami T** Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the

- angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 273:8890-8896
56. **Widmaier EP, Lim AT, Vale W** 1989 Secretion of corticotropin-releasing factor from cultured rat hypothalamic cells: effects of catecholamines. *Endocrinology* 124:583-590
57. **Johannes FJ, Prestle J, Eis S, Oberhagemann P, Pfizenmaier E** 1994 PKC μ is a novel, atypical member of the protein kinase C family. *J Biol Chem* 269:6140-6148
58. **Ruzycky AL, Jansson T, Illsley NP** 1996 Differential expression of protein kinase C isoforms in human placenta. *Placenta* 17:461-469
59. **Karl PI, Divald A** 1996 Protein kinase C in cultured human placental trophoblasts: identification of isoforms and role in cAMP signalling. *Biochem J* 320:831-836
60. **Rivera J, Beaven MA** 1997 Regulation of secretion from secretory cells by protein kinase C. in protein kinase C, Parker, P.J., Dekker, L.V. eds pp 133-166
61. **Fomina AF, Levitan ES** 1997 Control of Ca²⁺ channel current and exocytosis in rat lactotrophs by basally active protein kinase C and calcineurin. *Neuroscience* 78:523-531
62. **MacNicol M, Schulman H** 1992 Cross-talk between protein kinase C and multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 267:12197-12201
63. **Gromada J, Hoy M, Renstrom E, Bokvist K, Eliasson L, Gopel S, Rorsman P** 1999 CaM kinase II-dependent mobilization of secretory granules underlies

acetylcholine-induced stimulation of exocytosis in mouse pancreatic β -cells. *J Physiol* 518:745-759

64. **Waters WW, Chen PL, McArthur NH, Moreno PA, Harms PG** 1998
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II involvement in release of gonadotropin-releasing hormones. *Neuroendocrinology* 67:145-152

Benes C, Roisin MP, Huynh VT, Creuzet C, Miyazaki JI, Fagard R 1998 Rapid activation and nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases in response to physiological concentration of glucose in the MIN6 pancreatic β cell line. *J Biol Chem* 273:15507-15513

Legends of the figures

Fig.1. Time course of basal CRF and hCG secretion by human placental trophoblasts in culture over a 7 days period. CRF and hCG 24 h secretion were determined by RIA and ELISA respectively, as described in *Materials and methods*. Data represent the mean \pm SE from 3 different placental cell preparations.

* <0.05 vs basal, ** <0.01 vs basal, *** <0.001 vs basal

Fig.2. Time course of basal CRF secretion by cultured syncytiotrophoblasts over a 24 h period. CRF secretion was determined by RIA as described in *Materials and methods*. Data represent the mean \pm SE from 3 different placental cell preparations.

Fig.3. Effect of BAPTA/AM and nitrendipine on KCl-induced CRF release. When appropriate cells were loaded with BAPTA/AM (20 μ M) for 30 min, and serum starved for 1 h. When present, nitrendipine (2 μ M) was added 10 min before KCl (40 mM) and incubated for 3 (a, b) or 8 h (c, d). CRF release (a, c) and total CRF content (b, d) were determined by RIA. Data represent the mean \pm SE from 3 different placental cell preparations.

** <0.01 vs basal

Fig.4. Effect of BAPTA/AM and nitrendipine on Bay K8644-induced CRF release. When appropriate cells were loaded with BAPTA/AM (20 μ M) for 30 min, and serum starved for 1 h. When present, nitrendipine (2 μ M) was added 10 min before Bay K8644 (5 μ M) and incubated for 3 (a, b) or 8 h (c, d). CRF release (a, c) and total CRF content (b, d) were determined by RIA. Data represent the mean \pm SE from 3 different placental cell preparations for 3h and 3 different placental preparations for 8h.

* <0.05 vs basal, + <0.01 vs control, ++ <0.001 vs control

Fig.5. Time-course of CaMKII activation by Bay K8644. Cells were serum starved 1 h. The medium was replaced by 200 μ l of fresh medium 10 min before the addition of Bay K8644 (5 μ M). At different interval of time, the medium was retrieved and ice cold lysis buffer (75 μ l) was added. The autonomous CaMKII activity was than measured as described in *Materials and methods*. Data represent the mean \pm SE from 3 different placental cell preparations.

* <0.05 vs basal

Fig.6. Time-course of ERK_{1/2} activation by Bay K8644. Cells were serum starved 1 h. The medium was replaced by 200 μ l of fresh medium 10 min before the addition of Bay K8644 (5 μ M). At different interval of time, the medium was retrieved and ice cold lysis buffer (75 μ l) was added. The phosphoERK_{1/2} immunoreactivity was than measured as described in *Materials and methods*. Data represent the mean \pm SE from 3 different placental cell preparations.

** <0.01 vs basal

Fig.7. Effect of Gö6976, AIP and PD 098056 on Bay K8644-induced CRF release. The cells were preincubated in serum-free DMEM for 1 h. Cells were serum starved for 1 h and Gö6976 (1 μ M), AIP (1 μ M), or PD 098056 (40 μ M) were added 10 min before Bay K8644(5 μ M) and incubated for 3 (a, b) or 8 h (c, d). CRF release (a, c) and total CRF content (b, d) were determined by RIA. Data represent the mean \pm SE from 3 different placental cell preparations.

* <0.05 vs basal

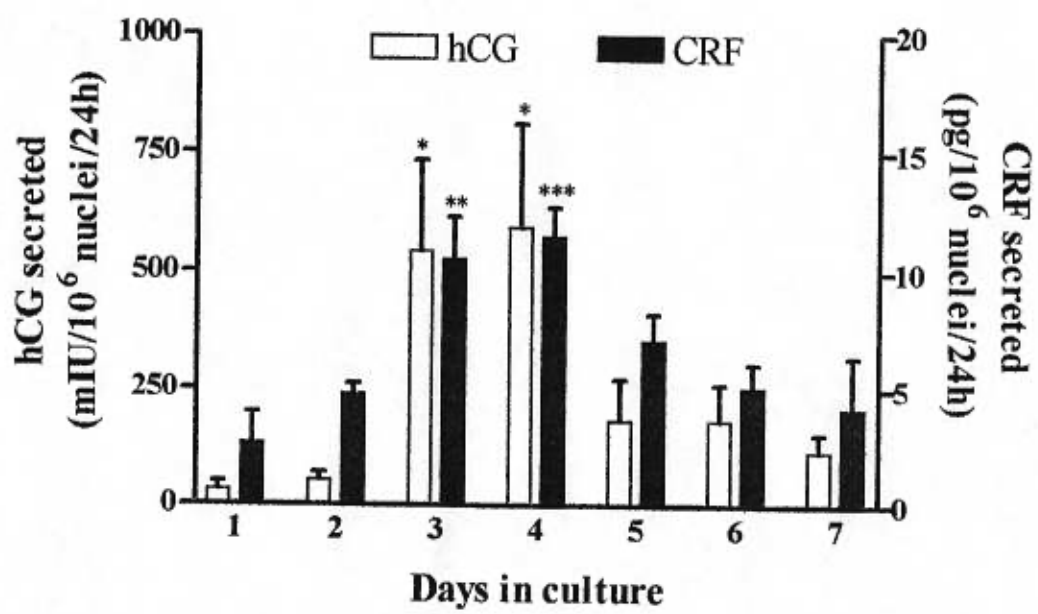


Fig.1.

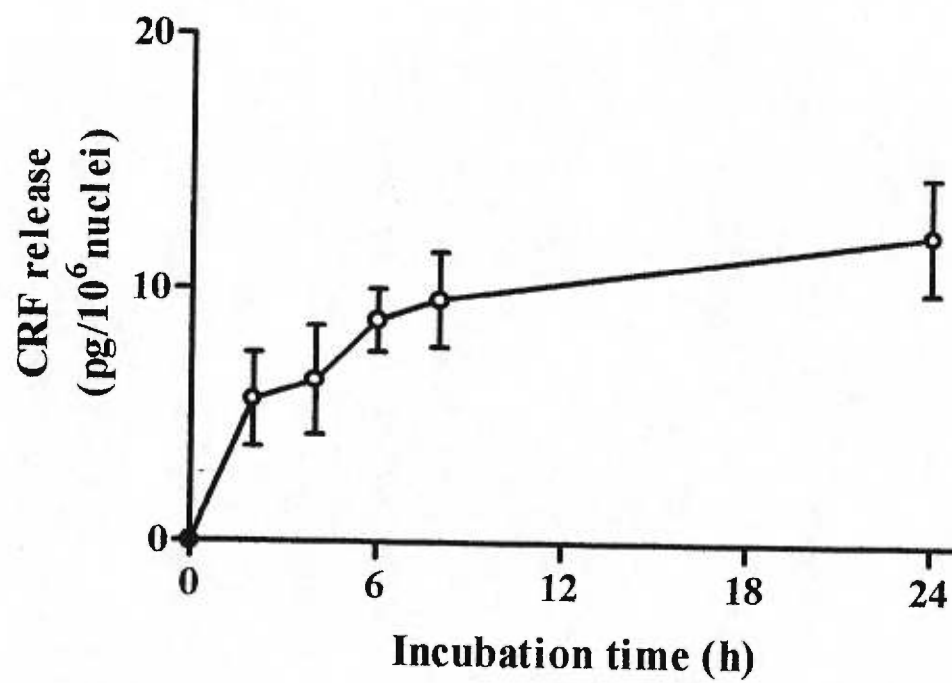


Fig.2.

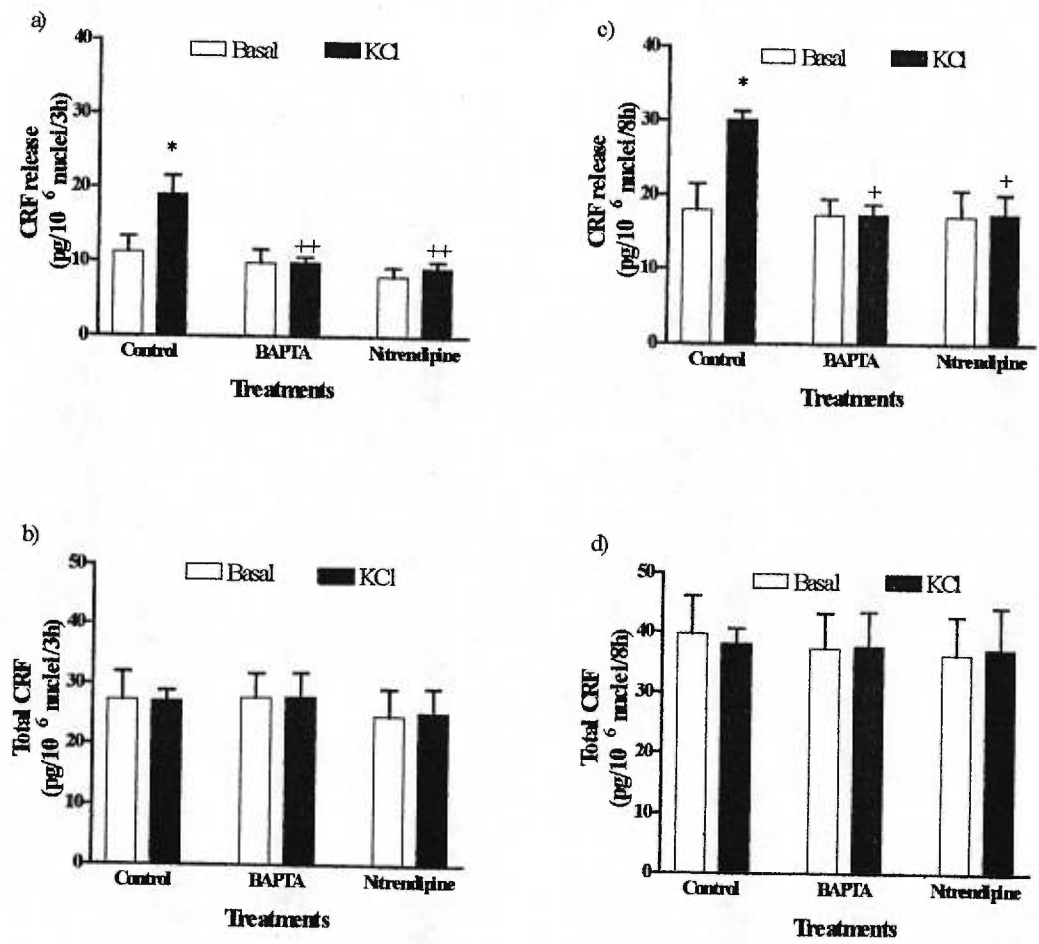


Fig.3.

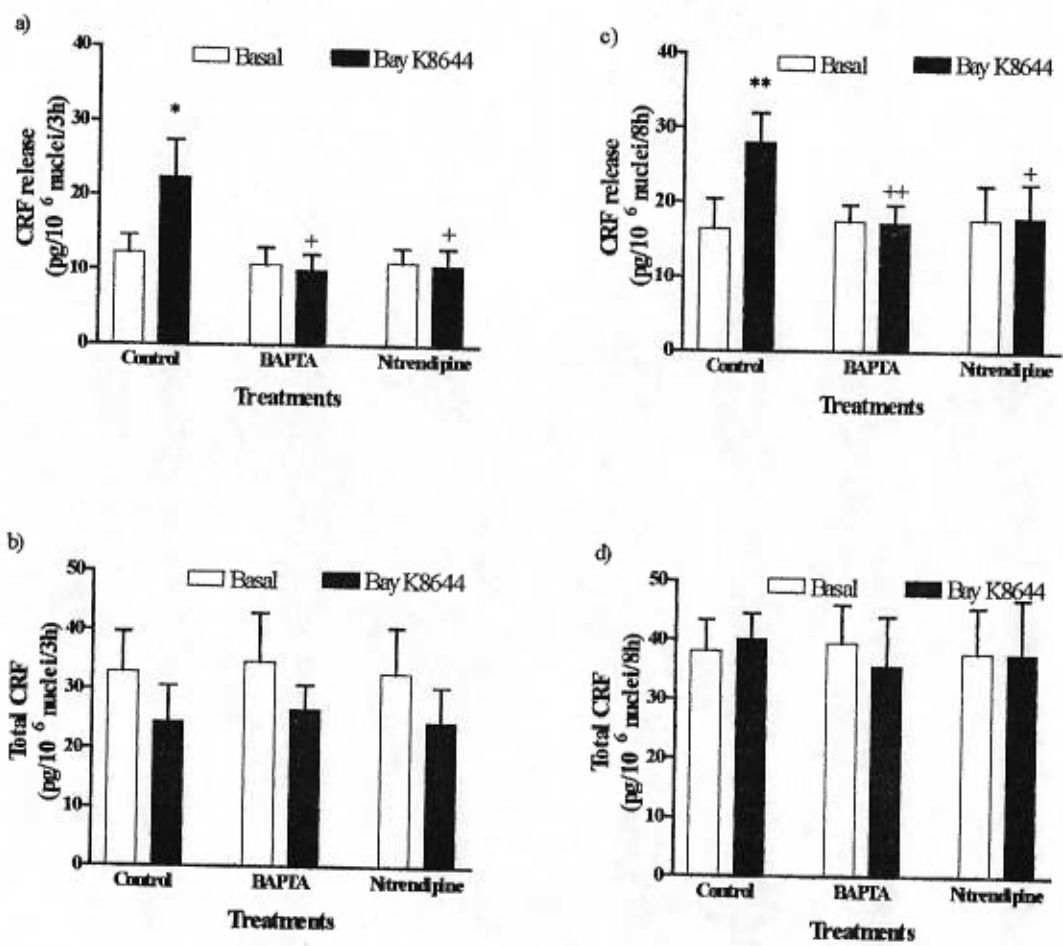


Fig4.

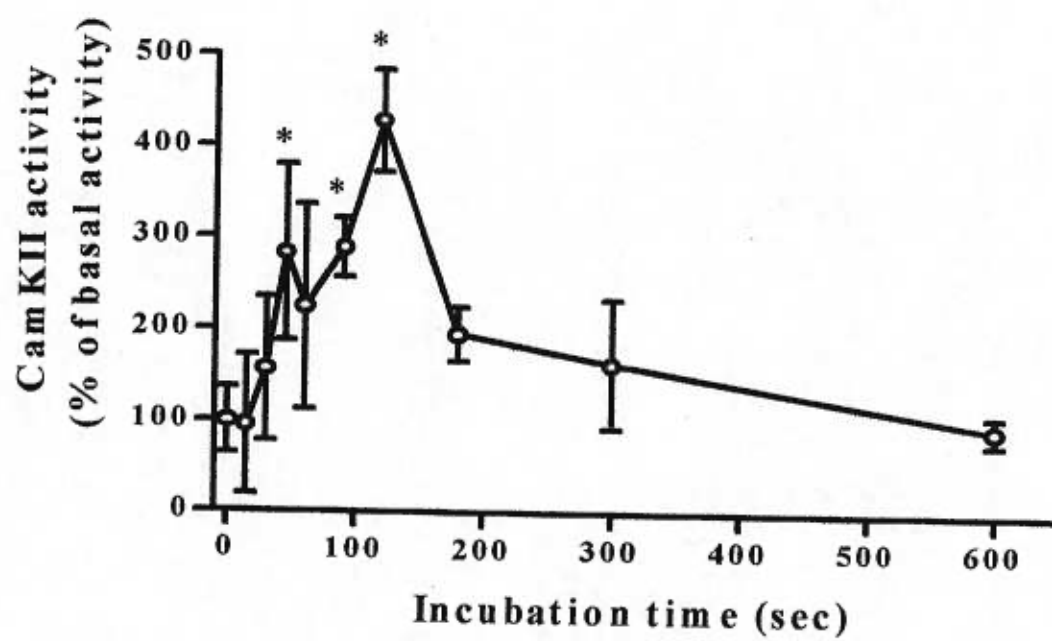


Fig.5.

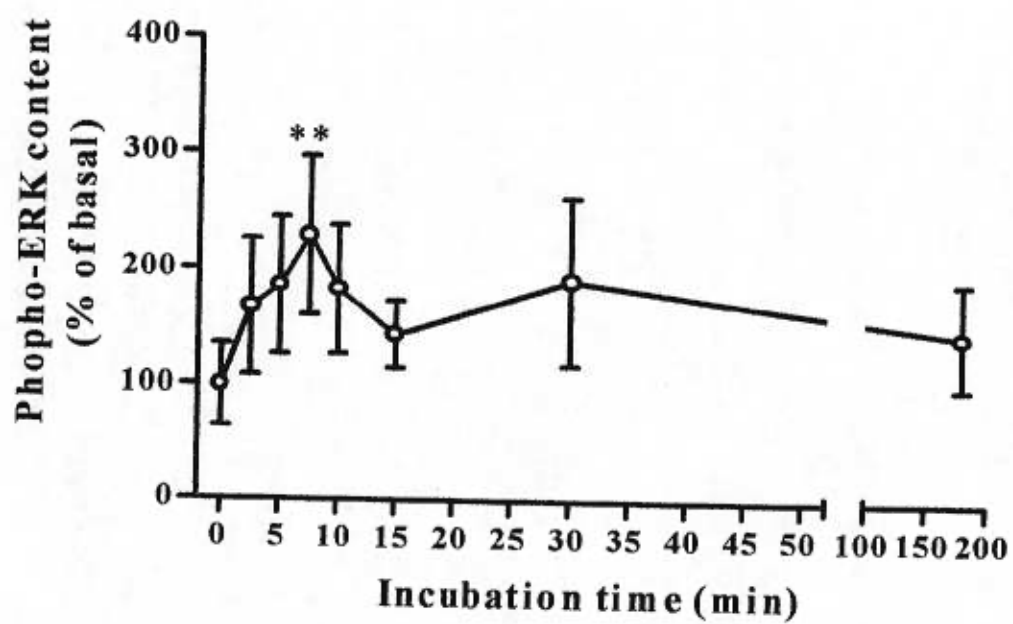


Fig.6.

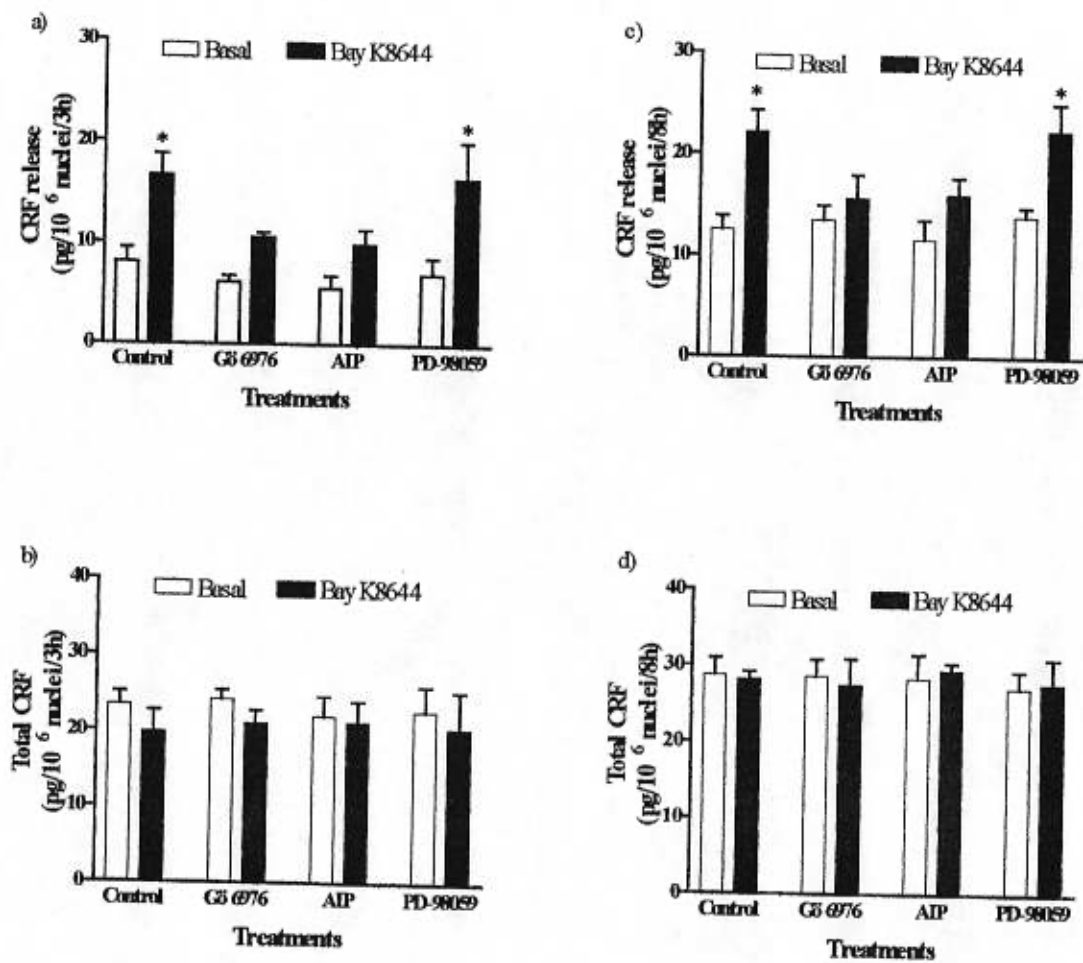


Fig.7.

CHAPITRE CINQUIÈME
TROISIÈME PAPIER

CHARACTERIZATION OF NEUROPEPTIDE Y MEDIATED CORTICOTROPIN
RELEASING FACTOR SYNTHESIS AND RELEASE FROM HUMAN PLACENTAL
TROPHOBLASTS

JACQUES ROBIDOUX^{1,2}, LUCIE SIMONEAU² SERGE ST-PIERRE³, ANDRÉ
MASSE¹ AND JULIE LAFOND^{1,2,4}. ¹PROGRAMME DES SCIENCES
BIOMÉDICALES AND GYNECOLOGY-OBSTETRICS DEPT., FACULTÉ DE
MÉDECINE, UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL; DÉPARTEMENTS DES ²SCIENCES
BIOLOGIQUES AND ³CHIMIE, UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL,
CANADA, H3C 3P8

Running title: NPY stimulates CRF synthesis and release

⁴ Address all correspondence to:

Prof. Julie Lafond

Université du Québec à Montréal, Département des Sciences Biologiques.

C.P. 8888, Succursale "Centre-Ville", Montréal, Québec, (Canada), H3C 3P8

Fax: (514) 987-4647

E-mail: lafond.julie@uqam.ca

Sous-pressé dans le numéro d'août d'Endocrinology (Août 2000)

ABSTRACT

Neuropeptide Y (NPY) is a CRF secretagogue for human placental cells in culture. We have studied the involvement of intracellular calcium and calcium-dependent signaling in the NPY-induced CRF release in trophoblastic cells. The incubation of trophoblasts with NPY for 3 and 8 h led to a dose-dependent increase in CRF secretion. Also, NPY stimulated synthesis of this peptide hormone upon an 8 h incubation period. BIBP3226, a selective Y_1 receptor antagonist, and pertussis toxin (PTX) eliminated these effects. NPY-stimulated CRF secretion was mostly prevented by loading cells with BAPTA-AM, suggesting that elevation of intracellular calcium is responsible for the increase of CRF secretion. However, this calcium chelator had no effect on CRF synthesis. Furthermore, U-73122, a phospholipase C- β s inhibitor or xestospongins C, an inositol triphosphate receptor (InsP₃-R) blocker, have partially prevented the effect of NPY on CRF synthesis and secretion. Therefore, the increase in CRF synthesis and secretion rely in part on the release of calcium from intracellular store. Interestingly, SKF 96365, an inhibitor of store operated calcium (SOC) influx, also partially blocked the NPY stimulatory effect on CRF release but not its synthesis, suggesting that calcium influx is also involved in this stimulation. In the syncytiotrophoblast, known to possess a NPY-activated protein kinase C (PKCs) activity, NPY also stimulated calcium calmodulin kinase II (CaMKII) and extracellular regulated kinase (ERK_{1/2}) activities. In the present study, we observed that bisindolylmaleimide (BIM), a non-specific PKCs inhibitor partially prevented the NPY-induced CRF release. On the other hand, autocamtide-2 related inhibitory peptide (AIP), a CaMKII inhibitor, prevented most of the stimulatory effect of NPY on both CRF synthesis and release. Gö6976, an inhibitor of the conventional and μ PKCs and PD 098059, an inhibitor of the ERK cascade, had no effect on neither CRF synthesis nor release. Altogether, these results support a Y_1 receptor mediated PTX sensitive induction on CRF synthesis and release by NPY from human placental trophoblasts. The stimulation of CRF synthesis by NPY seems to depend mainly on a PLC- β to InsP₃-R axis and on CaMKII activity. Also, the release of

CRF depends on the PLC- β to InsP₃-R axis and CaMKII activity, but also entails the participation of a calcium-independent PKCs.

Introduction

The functional placental unit, which includes fetal membranes (amnion and chorion), plays an important role in the maintenance of pregnancy, the growth of the fetus and in birth's timing. These pivotal roles of the placental unit are mainly accountable to its ability to produce a large variety of hormones and to its intimate relationship with both fetal and maternal compartments (1). The ultimate outcome of pregnancy, parturition, is still partially elucidated. Interestingly, the plethora of hormones, growth factors and cytokines produced by the placental unit during spontaneous labor and delivery indicates a well-organized process (2).

During the last few years, significant interest has been given to placental CRF. This great interest arises from the apparent link between the production of this peptide and the duration of pregnancy (3). In that regard, several studies indicated that maternal concentration of CRF is elevated during pregnancy reaching its highest level at the onset of labor (4,5), particularly during an abnormal pregnancy complicated by preterm labor (6).

The syncytiotrophoblast layer appears to be, at least in the third trimester, the principal cellular source of CRF (7) and therefore, most studies dealing with the control of this peptide's synthesis and release were conducted on trophoblast cells isolated from human term placenta. Isolated trophoblast cells from human term placenta undergo spontaneous syncytiotrophoblastic-like morphological and biochemical differentiation *in vitro* (8) and would reflect *in vivo* syncytiotrophoblast. Several studies (for a review (9)) pointed glucocorticoids and progesterone as the major regulators of placental CRF synthesis. However, many other putative CRF secretagogues have been identified, such as acetylcholine, angiotensin II, arginine vasopressin, catecholamines, interleukin-1, NPY, oxytocin, and prostaglandins (10-12). Nitric oxide has been reported as a negative regulator (13).

Among these secretagogues, NPY, a peptide produced by cytotrophoblastic cells, amnion, chorion and decidua (11, 14) is abundant in both plasma and amniotic fluids of woman throughout pregnancy (15). NPY binds to a mixed population of Y_1 and Y_3 receptors on the brush border membranes of human syncytiotrophoblast (16). These receptors are linked to multiple signal transduction cascades. Until now, no study intended to elucidate the mechanisms implicated in the modulation of placental CRF release. For that reason, we decided to investigate the mechanisms implicated in the NPY effects. The purpose of this study was to investigate the role of calcium signaling on the NPY induced CRF synthesis and release in cultured human trophoblast cells.

Materials and Methods

Placental trophoblast isolation and culture. Normal term placentas from either vaginal or caesarian delivery were obtained in accordance with the established guidelines of the ethical committee of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal. After delivery, the placentas were kept in 500 ml of cold (4 C) Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Life Technologies, Burlington, USA) containing: penicillin (200 U/ml), streptomycin (200 µg/ml), amphotericin B (5 µg/ml) and gentamycin (50 µg/ml). The trophoblast cells were isolated as previously described by Thiede (17), following the modifications reported by Stromberg *et al* (18) and Winkel *et al* (19). Briefly, the villous tissue (~75 g) was grossly minced, rinsed in HBSS containing the additives mentioned above, and cut again into smaller pieces, before being rinsed in 100 ml HBSS without calcium and magnesium on a rotary shaking incubator (50 rpm) for 10 min at 32 C. The rinsed tissue was after subjected to two consecutive digestions of 10 min in 120 ml of a similar medium containing 0.125 % trypsin (ICN, Montréal, Canada) and 0.02% deoxyribonuclease type I (Roche Molecular Biochemicals, Laval, Canada). Both supernatants were filtered over a succession of 200 µm and 60 µm sieves to remove aggregates. The digestion was stopped by the addition of 4% (v/v) of fetal calf serum (FCS) (Hyclone, Logan, Utah, USA). The cell suspension was centrifuged at 400 g for 10 min. The red blood cells were lysed in 140-mM ammonium chloride-TRIS-HCl buffer at 100 rpm for 15 min. The cells were then centrifuged at 350 g for 5 min, resuspended in HBSS, layered over a 10% percoll (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, Canada) and centrifuged at 450 g for 10 min. The resulting pellet was washed twice in Hank's balance salt solutions (HBSS) (Life Technologies, Burlington, USA) and once in culture medium by centrifugation at 350 g for 5 min. The isolated trophoblast cells were suspended in DMEM containing FCS (10 %), fatty acid-free bovine serum albumin (BSA) (0.5%) (ICN, Montreal, Canada), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml), amphotericin B (2.5µg/ml) and gentamycin (50µg/ml). After

cells counting and evaluation of viability by trypan blue exclusion (viability usually greater than 90 %), the cells were plated at a density of 1.7×10^6 per well in 24 well plates (Sarstedt, Montréal, Canada). The cells were incubated in a humidified atmosphere (95% air and 5% CO₂ at 37 C). The culture medium was changed after the first 3 h and changed every day thereafter. All experiments were done at the fourth day of culture. On that day, cells count was around 10^6 per well. This variation is inherent to the methods and the model, but intra-preparation variability as judged by protein determination of cellular lysate was not more than 15 %.

Evaluation of trophoblast phenotype. Using the above isolation procedure, we usually obtained cultures consisting of more than 90% trophoblast cells as judged by morphological and immunocytochemical determination of pan-cytokeratin-positive (epithelial cell marker; Sigma Chemical, St-Louis, MO, USA) and vimentin-positive cells (mesenchymal cell marker; Sigma Chemical, St-Louis, MO, USA) (20). Briefly, cells were growth for 12 h on plastic coverslips and were fixed for 10 min in acetone at -20 C. After evaporation, endogenous peroxidase activity was quenched by a 10 min incubation at 4 C with 3% H₂O₂ in methanol. Nonspecific binding was blocked by a 3 h incubation at room temperature with 5% skimmed milk, 3% FCS and 1% BSA. Primary antibody was diluted (1:200 for vimentin, 1:400 for cytokeratin) in TBS containing 0.1% tween and incubated for 1 h. The biotinylated second antibody included in histochemical ABC kit (Oncogene Research, Cambridge, MA, USA) was diluted in the same buffer and incubated for 1 h. An irrelevant antibody (trp E (Ab-1)), included in the kit, was used as first antibody for the control. All the following steps were done in accordance with the Oncogene's technical protocol, except that we also used the DAB enhancer from Sigma Chemical (St-Louis, MO, USA).

Measurements of CRF release by cultured trophoblasts. The levels of CRF release in the medium and in the cells were determined by RIA kit (Phoenix Pharmaceuticals, MountainView, CA, USA), following the Phoenix's technical protocol. The sensitivity of the CRF RIA kit was 23.9 ± 2.5 pg/tube. The inter-assay and within-assay variation coefficients at 16 pg/tube were 8.4% and 3.8%, respectively. On the fourth day of culture, the content of CRF was determined in the absence (basal) and the presence of NPY for 3h and 8 h. For all experiments, the treated cells were compared to cells exposed to the appropriate vehicle(s). Before each experiment, cells were serum starved for 1 h in DMEM containing 0.1% BSA. Afterward, the medium was replaced by 200 μ l of medium containing a 2X concentration of the agent used as treatment. Ten min later, NPY (200 μ l of a 2×10^{-7} M stock) was added and incubated for the appropriate time. The medium present in each well was collected, centrifuged at 350 g for 5 min, evaporated to dryness before being stored at -20 C until assayed. For the intracellular CRF content, cells were lysed by the addition of 200 μ l of HBSS containing 0.1% Nonidet P-40, followed by a 5 sec sonication. The resulting medium was treated as described above.

Evaluation of the promotion of the autonomous form of CaMKII. The method used was essentially described by Abraham *et al* (21) with minor modifications. Briefly, cells were serum starved for 1 h in DMEM containing 0.1% BSA, than the medium was changed for 200 μ l of fresh medium and preincubated for 10 min. Afterward, NPY (200 μ l of a 2×10^{-7} M stock) was added and the cells were incubated for different interval of time. At the end of the incubation, the medium was aspirated and replaced by 75 μ l of an ice cold lysis buffer constituted of an 1:1 mixture of calcium/magnesium-free HBSS and 50 mM MOPS buffer containing 1% Nonidet P-40, 20 mM sodium pyrophosphate, 4 mM dithiothreitol, 2 mM NaF, 2 mM EGTA, 1 mM ammonium molybdate, 200 μ M PMSF, 20 μ M leupeptine and 1 μ g/ml aprotinin. Following a 5 seconds sonication, the protein content of the lysates (75.9 ± 11.4 μ g/well) was quantified by the BCA protein

assay (Pierce, Rockford, IL, USA). The autonomous CaMKII activity of the lysate was assayed by incubating 5 μg of the lysate in a total 25 μl mixture containing 50 μM autocamtide-2 and 10 μM [γ - ^{32}P]ATP in 10 mM MOPS (pH 7.4) containing 10 mM magnesium chloride and 1 mM EGTA, at room temperature for 5 minutes. The reaction was stopped by the addition of 150 μl of ice cold 10% trichloroacetic acid. Samples were incubated for 30 minutes at 4 C and centrifuged at 10 000 g for 3 min. An aliquot (150 μl) of the supernatant was added to an equal volume of 30% trichloroacetic acid and the mixture was adsorbed on a MultiScreen phosphocellulose plates (Millipore, Nepean, Canada). Following three washes, the filters were punched into vials and counted using a liquid scintillation β counter after addition of 5 ml of Ready protein+ liquid scintillation cocktail (Beckman Canada, Missisauga, Canada). The specific incorporation into the synthetic peptide was determined as the differentiation in its presence or absence.

Evaluation of the ERKs activation. The phosphorylation status of ERKs is a quantitative indicator of ERKs activation. Therefore, the evaluation of ERKs activation was done by Western blot using an anti-phosphoERKs antibody purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Briefly, cells were serum-starved for 3 h, preincubated for 10 min in 200 μl fresh serum-free medium and incubated in the presence of NPY 10^{-7} M, for an additional 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 30 and 180 min. At the end of the incubation, the medium was aspired and replaced by 75 μl of SDS loading buffer containing 80 μM sodium vanadate, 80 μM sodium pyrophosphate, 10 mM EDTA, 0.8 mg/ml benzamidine, 80 μM PMSF, 0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pepstatin, and 0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin. The protein content of the lysates (80.2 ± 12.0 $\mu\text{g}/\text{well}$) was quantified by a modification of the Bradford method (22). Proteins (10 μg) were loaded on an alkaline tricine-SDS-PAGE system consisting of a 4 % stacking gel and a 12 % acrylamide-glycerol separating gel (23), using a Mini-Protean II system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). After migration, proteins were transferred to PVDF membrane (Roche Molecular

Biochemicals, Laval, Canada) using a semi-dry system (Millipore, Nepean, Canada). The membrane was blocked overnight at 4 C in Tris-buffered saline containing 0.05 % tween (TBS-T), 5% skimmed milk, 3% FCS, and 1% BSA. These membranes were blotted for 1 h at room temperature with the anti-phosphoERKs antibody (1:1000 in TBS-T), washed three times with TBS-T, and incubated for 1 h in TBS-T containing 0.5% skimmed milk, 0.3% FBS, and 0.1% BSA and a horseradish peroxidase-coupled anti-rabbit IgG antibody (1:1250) (Roche Molecular Biochemicals, Laval, Canada). Finally, the immunoreactive bands were developed by chemiluminescent (Roche Molecular Biochemicals, Laval, Canada). The specific bands were quantified by densitometry scanning of the X-ray film using the Personal Densitometer (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA) and analyzed with ImageQuant software (Sunnyvale, CA, USA).

Data analysis. For each cells preparation (n = 3-5), experiments were done in duplicate or triplicate, as described, at a given condition or time point. The mean of such replicates was used as a single datum point for analysis. When time-course or dose-response protocols were analyzed, ANOVA on repeated measures followed by Dunnett's *post-hoc* test were used. Otherwise, Newman-Keuls test was used to compare multiple condition experiments.

Results

Modulation of CRF synthesis and release by NPY. Addition of NPY to trophoblastic cells stimulated the release of CRF in a concentration-dependent manner after 3h and 8 h ($P < 0.001$; Fig 1 a and b). For the 3 h incubation (Fig 1a), only the CRF release was significantly increased, the NPY effect was perceived at concentration ranging from 10^{-8} M ($P < 0.05$) to 10^{-6} M ($P < 0.01$). After a 8 h incubation with NPY, long enough to observe CRF synthesis, the peptide increased both CRF synthesis (total CRF content) and release at concentrations ranging from 10^{-8} to 10^{-6} M (Fig 1b; $P < 0.01$). Therefore, from now on, when we will mention NPY-induced CRF synthesis we will always refer to the 8 h experiment, since no modification of total CRF content was observed during any of the 3 h experiments (Fig 1a, 2b, 3b, 4b, and 7b). The NPY (10^{-7} M) increased CRF release by 2 and 3-fold at 3h and 8 h, respectively. The NPY potency to induce CRF release was slightly different between the 3h and 8 h incubations (with pEC_{50} of 9.59 ± 0.61 and 8.93 ± 0.38 respectively; $P < 0.05$). However, the NPY potency to induce CRF release at the longer incubation time was identical to its potency to induce CRF synthesis (pEC_{50} 8.93 ± 0.62).

Syncytiotrophoblast presents a mixed population of binding sites for NPY, namely Y_1 and Y_3 (16). To further characterize the NPY receptor subtype(s) involved in the NPY effects, we preincubated the cells for 10 min with 5 μ M BIBP 3226, a specific antagonist of the Y_1 subtype (24). The results showed that this subtype is fully accountable for the effect of NPY 10^{-7} M on both CRF synthesis and release (Fig 2, a, c, and d) since BIBP 3226 prevented both effects. In most cell types, the Y_1 receptors are linked to PTX-sensitive G proteins. Since no studies have reported this kind of coupling in trophoblastic cells, we preincubated the cells overnight with 500 ng/ml of PTX. As expected, the toxin eliminated the effect of NPY on both CRF synthesis and release (Fig 2a, c, and d).

Implication of calcium in NPY-induced CRF synthesis and release. To examine the involvement of intracellular calcium in NPY-induced CRF synthesis and release in

trophoblastic cells, we loaded the cells (30 min) with 20 μ M BAPTA/AM, an intracellular calcium chelator. As shown in Fig 3a and 3c, BAPTA prevents 50% of the NPY-induced CRF release at 3h ($P < 0.05$) and 75% at 8 h ($P < 0.01$). Nonetheless, no effect of the calcium chelation could be discerned on CRF synthesis (Fig 3d). The calcium implicated in the NPY-induced CRF-release could originate from either extracellular calcium influx or intracellular store release. Therefore, we investigated both possibilities. Since depolarization-induced CRF release has been reported (13); we investigated the involvement of L-type calcium channels in the NPY effects. The result showed that the L-type calcium channels specific blocker, nitrendipine (2 μ M) did not prevent the effects of NPY on either CRF synthesis or release (Fig 3a, c, and d). In syncytiotrophoblasts, NPY is known to activate PLC- β (16). Two strategies have been elaborated in order to examine the contribution of the NPY to InsP₃-R pathway: 1) cells incubation with U-73122 (5 μ M), a inhibitor of G-protein coupled receptors activation of PLC- β (25), and 2) cells incubation with xestospongin C (1 μ M), an InsP₃-R blocker (26). As shown in Fig 4a and c, both agents reduced CRF release after 3h and 8 h ($P < 0.01$). Surprisingly, U-73122 and xestospongin C treatments eliminated ($P < 0.001$) the NPY effects on CRF synthesis (Fig 4d). Because prolonged stimulation of calcium release will empty the stores without refilling them, we incubated the cells with SKF 96365 (50 μ M), a SOC influx blocker (27). Figures 4a and 4c showed that SKF 96365 reduces the NPY-induced CRF release by 65% after 3 h ($P < 0.05$) and 50% after 8 h ($P < 0.05$). Such an effect of the blocker on NPY-induced CRF synthesis (Fig 4d) was less obvious since NPY-stimulated CRF release was still important ($P < 0.01$).

Activation of CaMKII and ERKs by NPY. Because of the importance of calcium in the NPY-induced CRF release, we postulated that calcium dependent kinases might be involved in this process. Since we have evidences of PKCs (16) and calcium-dependent ERKs activation (data not shown) by NPY, we investigated the activation of both CaMKII and ERK by NPY to ascertain their involvement in the signal transduction pathways connecting NPY to CRF synthesis and release.

The CaMKII is characterized by an activation-dependent autophosphorylation leading to the promotion of a calcium/calmodulin independent activity (28). Therefore, a time-course experiment was conducted to evaluate the induction of the autonomous form of the kinase in presence of NPY (10^{-7} M). As shown in Fig 5, NPY produced a rapid promotion of the autonomous form of CaMKII. This activation was already apparent after 15 sec ($P < 0.05$) and the activity was maintained for an additional 30 sec, before gradually returning to the basal level.

ERKs are catalytically activated by phosphorylation (29), which can be monitored by Western blot using a phosphoERKs antibody. A time-course experiment was then conducted to evaluate the induction of the phosphorylated form of the kinases in presence of NPY (10^{-7} M). As shown in Fig 6, the incubation of cells with NPY leads to a sustained ERKs activation

Effect of the protein kinase inhibitors on NPY induced synthesis and release of CRF. To evaluate the involvement of the activation of PKCs, CaMKII and ERKs by NPY on the stimulation of CRF synthesis and release, the cells were incubated in presence of specific inhibitors of the three-kinase families. As shown in Fig 7a and 7c, cells incubation with BIM (50 nM), a non-isotype specific inhibitor of PKCs (30), inhibited NPY-induced CRF release ($P < 0.05$), but had no effect on CRF synthesis (Fig 7d). Interestingly, the use of Gö6976 (1 μ M), a specific inhibitor of the conventional (calcium-dependent) and μ PKCs (31, 32), had no effect on both NPY-induced release and synthesis (Fig 7a, c, and d). On the other hand, CaMKII, another calcium-dependent kinase, appears to be linked to both synthesis and release, since the presence of AIP (1 μ M), a specific inhibitor of this kinase (33), reduced NPY-induced CRF release by 45% after 3 h and totally prevented NPY-induced CRF synthesis and release after 8 h (Fig 7c and d). Finally, the cells incubation with PD 098056 (40 μ M), an ERK kinase inhibitor (34), had no significant effect on NPY-induced CRF synthesis or release (Fig 7a, c and d).

Discussion

The syncytiotrophoblast layer of human placenta has been suggested to be the main source of immunoreactive and biologically active CRF during the third trimester of human pregnancy (7, 35). In this regard, cytotrophoblasts freshly isolated from human term placenta have an undetectable level of CRF (36). However, in parallel with their spontaneous differentiation to syncytiotrophoblast-like structure *in vitro*, they acquire the ability to produce and release CRF (10, 36). NPY is also produced by the placental unit (11, 14), and could be implicated in the stimulation of CRF release by the syncytiotrophoblast (11).

All studies took place on the fourth day of culture, since preliminary experiments have showed that this period coincides with the peak of secretory competence for both CRF and hCG (data not shown). This is in accordance with the syncytiotrophoblastic origin of these peptides. The syncytiotrophoblast model used, even though costly, time-consuming and variable from preparation to preparation has the advantage to rely on nontransformed cells containing the endogenous CRF gene. The present study shows that addition of NPY to trophoblastic cells, on their fourth day in culture, results in an increase in CRF synthesis and release. The stimulation of CRF release by NPY from these cells during the 3-h incubation period is similar to previous result reported by Petraglia et al. (11). Moreover, we showed for the first time that NPY modulates CRF synthesis in trophoblastic cells. An up-regulation of CRF synthesis has been reported in Y_2 receptor bearing SK-N-BE2 cells transfected with the human CRF promoter (37). Taking into account the up-regulated synthesis, the NPY effect on CRF release between 3h and 8 h appears mainly derived from this novel synthesis. After consideration, it could mean that during a short incubation period (3 h), the NPY induces the release of preformed vesicles containing CRF, while longer incubation period (8 h) allows the production and the processing of new CRF by the trophoblastic cells.

The syncytiotrophoblast displays on its maternal surface two types of NPY binding sites, the Y_1 and Y_3 subtypes (16). Since NPY could stimulate CRF synthesis and release by interacting with either one of them, we explored this possibility with the highly specific Y_1 antagonist, BIBP3226 (24). This molecule completely abolished the NPY-induced CRF synthesis and release, thus strongly supporting the involvement of Y_1 receptor subtype in the neuropeptide effects. Our results also showed that a pretreatment of trophoblastic cells with PTX, known to inactivate G_i and G_o proteins by ADP ribosylation (38), caused a total inhibition of the NPY-induced CRF synthesis and release, suggesting that some PTX-sensitive G-proteins are involved in this syncytiotrophoblast response to NPY. This result is not surprising since in most cell types studied, the Y_1 receptor is PTX-sensitive (39).

Calcium-dependent CRF secretion has already been suggested in placental explants and cells (13, 36, 40). In these studies, KCl induced a marked increase in CRF release, which could be attributable to a depolarization-induced calcium influx in secreting cells. In that respect, a study done on microdialyzed median eminence has shown that basal and KCl-induced CRF releases are mediated by L-type calcium channel activation (41). Since syncytiotrophoblast has been shown to possess these channels (42), as well as L-type calcium channels dependent secretion process (43, 44), we used BAPTA/AM and nitrendipine to investigate the possible involvement of calcium and these channels in the NPY effects. The reduction of NPY-induced CRF release in presence of BAPTA/AM strongly suggest the involvement of calcium in CRF release, while the involvement of L-type calcium channels is unlikely according to the nitrendipine ineffectiveness. The fact that this blocker has no effect on NPY-induced CRF release is not surprising, since Y_1 receptors, at the exception of those found in vascular smooth muscles, are generally linked to L-type calcium channels inhibition (39) and therefore cannot account for the stimulation.

Our previous study (16) has demonstrated that Y_1 receptors of human syncytiotrophoblasts are linked to PLC- β activation. This activation leads to the

cleavage of PtdInsP₂, which generates 1,2 diacylglycerol (an activator of cPKCs and nPKCs) and Ins (1,4,5)P₃ (which has a permissive effect on IP₃-R) (45). The inhibition of NPY-induced CRF release and synthesis by U-73122 indicates that PLC- β activation is partially responsible for the NPY effect, and almost totally accountable for the NPY-induced CRF synthesis. However, a report showing a decrease of PYY binding to Y₁ receptor following U-73122 incubation (46) prompted us to further investigate the involvement of InsP₃-releasable intracellular stores, by using the InsP₃-R blocker, xestospongin C. The results obtained with xestospongin C reflect those obtained using the aminosteroid inhibitor of PLC- β , indicating that a decrease of NPY binding, while not excluded, cannot explain the inhibition seen with the use U-73122. Therefore, we propose that in trophoblastic cells, NPY binds to its receptors which in turn activates PLC- β . The generated InsP₃ binds its receptor, induces calcium release from the intracellular store, which is responsible for the NPY-induced CRF synthesis and release.

The use of SKF 96365 (an inhibitor of the receptor-mediated calcium influx, the voltage-operated calcium channels (47) and SOC influx (27)) was initially planned to investigate the influence of SOC calcium influx on the NPY-induced CRF synthesis and release. The lack of specificity of this wide-range tool is not a problem since many aspects of the calcium entry in syncytiotrophoblasts remain to be elucidated. Also, it is likely to involve multiple calcium influx pathways. In the first time, our results showed that SOC influx is implicated only in NPY-induced CRF release. In the presence of NPY, either SKF 96365 or BAPTA/AM should induce the emptying of the calcium stores, while the presence of U-73122 or xestospongin C should not. These results suggest that the emptying of the store mediated by NPY could induced the activation of a pathway implicated in CRF synthesis.

Our results obtained in presence of BAPTA lead also to another interrogation: Why the calcium influx, which should be induced by the presence of this chelator alone (48), is not enough by itself to induce the release of CRF? A possible explanation is that calcium influx following the emptying of intracellular stores, even if SKF 96365 seems to be as

efficient as U-73122 or xestospongin C in reducing NPY-induced CRF release, is not the sole factor to its release, but rather a cofactor.

In the placenta, where PKCs are activated by NPY (16), nothing has been published on either CaMKII or ERKs activities. To our knowledge, our results report a novel relationship between phosphoERKs immunoreactivity or activity and G protein-coupled receptor in trophoblastic cells. Our results clearly show that NPY promotes the autonomous form of CaMKII. The kinetic of the stimulation is rapid and transient, meaning that either the NPY effect on CaMKII could be rapidly desensitized or that the receptor could be rapidly internalized. In this regard, ERKs activation has been reported for G protein-coupled receptor endocytosis (49).

ERKs are known as downstream effectors of Y_1 receptors (50, 51). We have measured the ERKs activation by their phosphorylation status (52), in presence of NPY. Our results showed a biphasic activation of the ERKs by NPY, a first activation that is rapid, followed by a sustained phase. Usually, the studies on ERKs activity induced by G protein-coupled receptors look at short period, since a peak of ERKs activity is normally found between 2 and 10 min. The significance of the sustained ERK activation is intriguing, but not uncommon for receptor linked to PTX-sensitive G proteins (53). Phosphatidylinositol 3-kinase, Ras- and PKC-dependent processes have been proposed for the Y_1 receptor-mediated ERKs activation (50, 51). Nevertheless, a considerable amount of work has to be done in order to ascertain which of these or other pathways are implicated in trophoblastic cells.

Many studies, mainly done on hypothalamic cells have involved protein kinase A (PKA) and PKCs as inducers of CRF synthesis and release (54, 55). However, in syncytiotrophoblast, there is only evidence of the involvement of PKC in the inhibition of CRF release (36). Our results indicate that CaMKII, ERKs and calcium-independent PKCs are regulators of CRF release and/or synthesis. The use of the non-isotype specific PKC inhibitor, BIM, inhibited NPY-induced CRF release but not its synthesis, while the

conventional and μ PKCs inhibitor, Gö6976, did not. This means that novel or atypical subtypes of PKCs are implicated in the NPY-induced CRF secretion and could represent the cofactors associated with SOC influx responsible for CRF release. However, the PKC isotypes activated following NPY receptors activation are not known in syncytiotrophoblast. Previous studies have shown the presence of the three subfamilies of PKCs in syncytiotrophoblast (56, 57). Since Y_1 receptors are linked to PLC and to phosphatidylinositol 3-kinase (16), both novel and atypical PKCs could be involved. The non-implication of PKC in the CRF synthesis induced by NPY is probably tissue specific, since PKCs have been shown to be implicated in CRF gene expression in transiently transfected chicken macrophages (58).

CaMKII is a ubiquitous enzyme that has been implicated in peptide hormone secretion (59, 60). Our results with AIP clearly showed the involvement of this kinase in NPY-induced CRF synthesis and release. The exact nature of the substrates involved in the CaMKII action on CRF release is still unclear. In mouse pancreatic B-cells, this kinase is involved in the early steps of the exocytotic machinery leading to insulin release (60). The CaMKII has been implicated in the increasing of the size of the readily releasable vesicle pool and in the decreasing time for the refilling of the vesicles. Then, the implication of CaMKII in the NPY-stimulated CRF synthesis is in accordance with previous studies (37, 61). In these reports, NPY has been shown to induce CaMKII activity, which phosphorylates the cAMP response element binding protein (CREB). The phosphorylated CREB interacts with the cAMP response element (CRE) within several genes and leads to their transcription (37). Since CREs are found in the CRF promoter (58, 62), we could hypothesize that a similar mechanism could be involved in trophoblastic cells. Nevertheless, there is still a considerable amount of work that has to be done in order to ascertain the role of CREB in the NPY-induced CRF synthesis.

In conclusion, our study indicated that Y_1 receptor links NPY to CRF synthesis and release in trophoblastic cells. Furthermore, our results indicate that these NPY effects are involved the PLC-InsP₃-R axis and the CaMKII. They also showed that calcium

independent PKCs are implicated in the stimulatory effects of NPY on CRF release. Our results suggest the existence of a diversity of biochemical pathways connecting the Y₁ receptor to the CRF synthesis and release. Nonetheless, further studies are necessary to elucidate the sequence of their involvement. Our results also suggest that we can add PTX-sensitive G protein-coupled receptors, like the NPY-Y₁ receptor, to the growing list of modulators of CRF synthesis and release.

Acknowledgements

We express our gratitude to Mrs Christiane Paré (Chief of Nursing) and the staff of the Department of Obstetrics and Gynecology of Pavillon St-Luc of the Centre Hospitalier Universitaire de Montréal (CHUM) for the donation of placentas. We are also grateful to Dr. Robert Moreau for his critical comments and suggestions and to Mélanie Laramée for editorial assistance. This study was supported by grants from Université du Québec à Montréal (J. Lafond). J. Robidoux was the recipient of a FRSQ-FCAR santé doctoral studentship.

References

1. **Evain-Brion D** 1999 Maternal endocrine adaptations to placental hormones in humans. *Acta Paediatr Suppl* 428:12-16
2. **Petraglia F, Florio P, Nappi C, Genazzani AR** 1996 Peptide signaling in human placenta and membranes: autocrine, paracrine, and endocrine mechanisms. *Endocr Rev* 17:156-186
3. **McLean M, Bisit A, Davies J, Woods R, Lowry PJ, Smith R** 1995 A placental clock controlling the length of human pregnancy. *Nat Med* 1:460-463
4. **Goland RS, Waedlaw SL, Stark RI, Brown LS, Frantz AG** 1986 High levels of corticotropin-releasing hormone immunoreactivity in maternal and fetal plasma during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 63:1199-1204
5. **Campbell EA, Linton EA, Wolfe CDA, Scraggs PR, Jones MT, Lowry PJ** 1987 Corticotropin-releasing hormone concentrations during pregnancy and parturition. *J Clin Endocrinol Metab* 64:1054-1059
6. **Warren WB, Patrick SL, Goland RS** 1992 Elevated maternal plasma corticotropin-releasing hormone levels in pregnancies complicated by preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 166:1198-1202
7. **Riley SC, Walton JC, Herlick JM, Challis JRG** 1991 The localization and distribution of corticotropin-releasing hormone in the human placenta and fetal membranes throughout gestation. *J Clin Endocrinol Metab* 72:1001-1007

8. **Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM, Strauss JF** 1986 Purification, characterization, and *in vitro* differentiation of cytotrophoblasts from human term placenta. *Endocrinology* 118:1567-1582
9. **Karalis K, Goodwin G, Majzoub JA** 1996 Cortisol blockade of progesterone: a possible molecular mechanism involved in the initiation of human labor. *Nature Med* 2:556-560
10. **Petraglia F, Sutton AN, Vale W** 1989a Neurotransmitters and peptides modulate the release of immunoreactive corticotropin-releasing factor from cultured human placental cells. *Am J Obstet Gynecol* 160:247-251
11. **Petraglia F, Calzà L, Giardino L, Sutton S, Marrama P, Rivier AR, Genazzani AR, Vale W** 1989b Identification of immunoreactive neuropeptide-~~Y~~ in human placenta: localization, secretion, and binding sites. *Endocrinology* 124:2016-2022
12. **Petraglia F, Garuti GC, De Ramundo B, Angioni S, Genazzani AR, Bilezikjan LM** 1990 Mechanisms of action of interleukin 1~~α~~ in increasing corticotropin-releasing factor and adrenocorticotrophin hormone released from cultured human placental cells. *Am J Obstet Gynecol* 163:307-312
13. **Sun K, Smith R, Robinson PJ** 1994 Basal and KCl-stimulated corticotropin-releasing hormone release from placental syncytiotrophoblasts is inhibited by sodium nitroprusside. *J Clin Endocrinol Metab* 79:519-524
14. **Petraglia F, Calzà L, Giardino L, Zanni M, Florio P, Ferrari AR, Nappi C, Ganazzani AR** 1993 Maternal decidua and fetal membranes contain immunoreactive neuropeptide Y. *J Endocrinol Invest* 16:201-205

15. **Petraglia F, Coukos G, Battaglia C, Bartolotti A, Volpe A, Segre A, Genazzani AR** 1989c Plasma and amniotic fluid immunoreactive neuropeptide Y level changes during pregnancy, labor and at parturition. *J Clin Endocrinol Metab* 69:324-328
16. **Robidoux J, Simoneau L, St-Pierre S, Ech-Chadli H, Lafond J** 1998 Human syncytiotrophoblasts NPY receptors are located on BBM and activate PLC-to-PKC axis. *Am J Physiol* 274:E502-E509
17. **Thiede HA** 1960 Studies of the human trophoblast in tissue culture. I. Cultural methods and histochemical staining. *Am J Obstet Gynecol* 79: 636-647
18. **Stromberg K, Azizkhan JC, Speeg KV** 1978 Isolation of functional human trophoblast cells and their partial characterization in primary culture. *In Vitro* 14:631-638
19. **Winkel CA, Smyder JM, Macdonald PC, Simpson ER** 1980 Regulation of cholesterol and progesterone synthesis in human placental cells in culture by serum lipoproteins. *Endocrinology* 106:1054-1060
20. **Contractor SF, Routledge A, Sooranna SR** 1984 Identification and estimation of cell types in mixed primary cell cultures of early and term human placenta. *Placenta* 3:41-54
21. **Abraham ST, Bencotter H, Schworer CM, Singer HA** 1996 *In situ* Ca^{2+} dependence for activation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 271:2506-2513
22. **Pande SV, Murthy MSR** 1994 A modified micro-Bradford procedure for elimination of interference from sodium dodecyl sulfate, other detergents, and lipids. *Anal Biochem* 220:424-426

23. **Schägger H, von Jagow G** 1987 Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166:368-379
24. **Rudolf K, Eberlein W, Engel W, Wieland HA, Willim KD, Entzeroth M, Wiener W, Beck-Sickinger AG, Doods HN** 1994 The first highly potent and selective non-peptide neuropeptide Y Y₁ receptor antagonist: BIBP3226. *Eur J Pharmacol* 271:R11-R13
25. **Thompson AK, Mostafapour SP, Denlinger LC, Bleasdale JE, Fisher SK** 1991 The aminosteroid U-73122 inhibits muscarinic receptor sequestration, and phosphoinositide hydrolysis in SK-N-SH neuroblastoma cells. A role for G_p in receptor compartmentation. *J Biol Chem* 266:23856-23862
26. **Gafni J, Munsch JA, Lam TH, Catlin MC, Costa LG, Molinski TF, Pessah IN** 1997 Xestospongins: potent membrane permeable blockers of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor. *Neuron* 19:723-733
27. **Mason MJ, Mahaut-Smith MP, Grinstein S** 1991 The role of intracellular Ca²⁺ in the regulation of plasma membrane Ca²⁺ permeability of unstimulated rat lymphocytes. *J Biol Chem* 266:10872-10879
28. **Hanson PI, Schulman H** 1992 Neuronal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases. *Annu Rev Biochem* 61:559-601
29. **Cobb HM, Goldsmith EJ** 1995 How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem* 270:14843-14846
30. **Toullec D, Pianetti P, Coste H, Bellevergue P, Grand-Perret T, Ajakane M, Baudet V, Boissin P, Boursier E, Loriolle F, Duhamel L, Charon D, Kirilovsky J**

- 1991 The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem* 266:15771-15781
31. **Martiny-Baron G, Kazanietz MG, Mischak H, Blumberg PM, Kochs G, Hug H, Marmé D, Schächtele C** 1993 Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indocarbazole Gö 6976. *J Biol Chem* 268:9194-9197
32. **Gschwendt M, Dieterich S, Rennecke J, Kittstein W, Mueller HJ, Johannes FJ** 1996 Inhibition of protein kinase C μ by various inhibitors. Differentiation from protein kinase c isoenzymes. *FEBS Lett* 392:77-80
33. **Ishida A, Kameshita I, Okuno S, Kitani T, Fujisawa H** 1995 A novel highly specific and potent inhibitor of the calcium-dependent protein kinase II. *Biochem Biophys Res Comm* 212:806-812
34. **Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR** 1995 PD 098056 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem* 270:27489-27494
35. **Riley SC, Challis JRG** 1991 Corticotrophin-releasing hormone production by the placenta and fetal membranes. *Placenta* 12:105-119
36. **Ni X, Chan EG, Fitter JT, Smith R** 1997 Nitric oxide inhibits corticotropin-releasing hormone exocytosis but not synthesis by cultured human trophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 82:4171-4175
37. **Sheriff S, Dayal R, Kasckow, J, Regmi A, Chance W, Fischer J, Balasubramaniam A** 1998 NPY upregulates genes containing cyclic AMP response element in human neuroblastoma cell lines bearing Y1 and Y2 receptors: involvement of CREB. *Regul Pept* 75-76:309-318

38. **Spiegel AM** 1987 Signal transduction by guanine nucleotide binding proteins. *Mol Cell Endocrinol* 49:1-16
39. **Michel MC, Beck-Sinkinger A, Cox H, Doods HN, Herzog H, Larhammar D, Quirion R, Schwartz T, Westfall T** 1998 XVI. International union of pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors. *Pharmacol Rev* 50:143-150
40. **Thomson M, Chan EC, Falconer J, Madsen G, Smith R** 1988 Secretion of corticotropin-releasing hormone by superfused human placental fragments. *Gynecol Endocrinol* 2:87-100
41. **Gabr RW, Gladfelter WE, Birkle DL, Azzaro AJ** 1994 In vivo microdialysis of corticotropin-releasing factor (CRF): calcium dependence of depolarization-induced neurosecretion of CRF. *Neurosci Lett* 169:63-67
42. **Cimerikic B, Zamah R, Ahmed MS** 1998 Identification of L-type calcium channels associated with kappa opiod receptors in human placenta. *J Mol Neurosci* 10:261-272
43. **Petraglia F, Lim ATW, Vale W** 1987 Adenosine 3',5'-monophosphate, prostaglandins, and epinephrine stimulate the secretion of immunoreactive gonadotropin-releasing hormone from cultured human placental cells. *J Clin Endocrinol Metab* 65:1020-1025
44. **Petit A, Gallo-Payet N, Vaillancourt C, Bellabarba D, Lehoux JG, Belisle S** 1993 A role for extracellular calcium in the regulation of placental lactogen release by angiotensin-II and dopamine in human term trophoblastic cells. *J Clin Endocrinol Metab* 77:670-676

45. **Berridge MJ, Irvine RF** 1989 Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 341:197-205
46. **Parker SL, Parker MS, Sweatman T, Crowley WR** 1998 Characterization of G protein and phospholipase C-coupled agonist binding to the Y₁ neuropeptide Y receptor in rat brain: sensitivity to G protein activators and inhibitors and to inhibitors of phospholipase C. *J Pharmacol Exp Ther* 286:382-391
47. **Merritt JE, Armstrong WP, Benham CD, Hallam TJ, Jacob R, Jaxa-chamiec A, Leigh BK, McCarthy SA, Moores KE, Rink TJ** 1990 SK&F 96365, a novel inhibitor of receptor-mediated calcium entry. *Biochem J* 271:515-522
48. **Parekh AB, Penner R** 1997 Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev* 77:901-930
49. **Daaka Y, Luttrell, LM, Ahn S, Della Rocca GJ, Fergusson SSG, Caron MG, Lefkowitz RJ** 1998 Essential role for G protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 272:685-688
50. **Nakamura M, Sakanaka C, Aoki Y, Ogasawara H, Tsuji T, Kodama H, Matsumoto T, Shimizu T, Noma M** 1995 Identification of two isoforms of mouse neuropeptide Y-Y₁ receptor generated by alternative splicing. *J Biol Chem* 270: 30102-30110
51. **Mannon PJ, Raymond JR** 1998 The neuropeptide Y/peptide YY Y₁ receptor is coupled to MAP kinase via PKC and Ras in CHO cells. *Biochem Biophys Res Comm* 246:91-94

52. **Gorene I, Su X, Moreland RS** 1998 Inhibition of p42 and p44 MAP kinase does not alter smooth muscle contraction in swine carotid artery. *Am J Physiol* 275:H131-H138
53. **Meloche S, Seuwen K, Pagès G, Pouysségur J** 1992 Biphasic and synergistic activation of p44^{mapk} (ERK1) by growth factors: correlation between late phase activation and mitogenicity. *Mol Endocrinol* 6:845-854
54. **Widmaier EP, Lim AT, Vale W** 1989 Secretion of corticotropin-releasing factor from cultured rat hypothalamic cells: effects of catecholamines. *Endocrinology* 124:583-590
55. **Emanuel RL, Girard DM, Thull DL, Majzoub JA** 1990 Second messengers involved in the regulation of corticotropin-releasing hormone mRNA and peptide in cultured rat fetal hypothalamic primary cultures. *Endocrinology* 126:3016-3021
56. **Amane A, Simoneau L, Savard R, Lafond J** 1995 Identification and chromatographic separation of protein kinase C isotypes in syncytiotrophoblast brush border and basal plasma membranes of human placenta. *Int J Biol Chromatography* 1:237-246
57. **Karl PI, Divald A** 1996 Protein kinase C in cultured human placental trophoblasts: identification of isoforms and role in cAMP signalling. *Biochem J* 320:831-836
58. **Van LP** 1993 Phorbol ester stimulates the activity of human corticotropin-releasing hormone gene promoter via 3',5'-cyclic adenosine monophosphate response element in transiently transfected chicken macrophages. *Endocrinology* 132:30-34

59. **Waters WW, Chen PL, McArthur NH, Moreno PA, Harms PG** 1998 Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II involvement in release of gonadotropin-releasing hormones. *Neuroendocrinology* 67:145-152
60. **Gromada J, Hoy M, Renstrom E, Bokvist K, Eliasson L, Gopel S, Rorsman P** 1999 CaM kinase II-dependent mobilization of secretory granules underlies acetylcholine-induced stimulation of exocytosis in mouse pancreatic β -cells. *J Physiol* 518:745-759
61. **Sheriff S, Chance W, Fischer J, Balasubramaniam A** 1997 Neuropeptide Y treatment and food deprivation increase cyclic AMP response element-binding in rat hypothalamus. *Mol Pharmacol* 51:597-604
62. **Seasholtz AF, Thompson RC, Douglass JO** 1988 Identification of a cyclic adenosine monophosphate-responsive element in the rat corticotropin-releasing hormone gene. *Mol Endocrinol* 2:1311-1319

Legends of the figures

Fig.1. Effects of NPY on total CRF content and CRF release from human placental trophoblasts. The cells in their fourth day of culture were serum starved for 1 h and incubated for 3 or 8 h (a and b, respectively) in presence of increasing concentration of NPY. CRF content was determined in the medium and cells lysate by RIA. Data represent the mean \pm SE from 3 different placental cell preparations. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus basal)

Fig.2. Effect of BIBP3226 (Y_1 antagonist) and PTX on NPY-induced CRF synthesis and release. PTX treatments (500 ng/ml) were done overnight, than the cells were serum starved for 1 h. The BIBP3226 (5 μ M) was added 10 min before NPY (10^{-7} M) and incubated for 3 (a, b) or 8 h (c, d). CRF release (a, c) and total CRF content (b, d) were determined by RIA. Data represent the mean \pm SE from 3 different placental cell preparations. (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ versus basal and $^+P < 0.05$, $^{++}P < 0.01$ versus control)

Fig.3. Effect of BAPTA/AM and nitrendipine on NPY-induced CRF synthesis and release. Cells were loaded with BAPTA/AM (20 μ M) for 30 min, and serum starved for 1 h. Nitrendipine (2 μ M) was added 10 min before NPY (10^{-7} M) and incubated for 3 (a, b) or 8 h (c, d). CRF release (a, c) and total CRF content (b, d) were determined by RIA. Data represent the mean \pm SE from 4 different placental cell preparations. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ versus basal and $^+P < 0.05$, $^{+++}P < 0.001$ versus control)

Fig.4. Effect of U-73122, xestospongine C and SKF 96365 on NPY-induced CRF synthesis and release. Cells were serum starved 1 h. U-73122 (5 μ M), xestospongine C (1 μ M) or SKF 96365 (50 μ M) were added 10 min before NPY (10^{-7} M) and incubated for 3 (a, b) or 8 h (c, d). CRF release (a, c) and total CRF content (b, d) were determined by RIA. Data represent the mean \pm SE from 3 different placental cell preparations. (* $P <$

0.05, ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ versus basal and $^+P < 0.05$, $^{++}P < 0.01$ $^{+++}P < 0.001$ versus control)

Fig.5. Time-course of CaMKII activation by NPY. Cells were serum starved 1 h. The medium was replaced by 200 μ l of fresh medium 10 min before the addition of NPY (10^{-7} M). At different interval of time, the medium was retrieved and ice cold lysis buffer (75 μ l) was added. The autonomous CaMKII activity was than measured as described in *Materials and methods*. Data represent the mean \pm SE from 3 different placental cell preparations. ($*P < 0.05$ versus basal)

Fig.6. Time-course of ERKs activation by NPY. Cells were serum starved 1 h. The medium was replaced by 200 μ l of fresh medium 10 min before the addition of NPY (10^{-7} M). At different interval of time, the medium was retrieved and ice cold lysis buffer (75 μ l) was added. The phosphoERKs immunoreactivity was than measured as described in *Materials and methods*. Data represent the mean \pm SE from 3 different placental cell preparations. ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$ versus basal)

Fig.7. Effect of BIM, Gö6976, AIP and PD 098056 on NPY-induced CRF synthesis and release. Cells were serum starved for 1h. BIM (50 nM), Gö6976 (1 μ M), AIP (1 μ M), or PD 098056 (40 μ M) were added 10 min before NPY (10^{-7} M) and incubated for 3 (a, b) or 8 h (c, d). CRF release (a, c) and total CRF content (b, d) were determined by RIA. Data represent the mean \pm SE from 5 different placental cell preparations. ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$ *** $P < 0.001$ versus basal and $^+P < 0.05$ versus control)

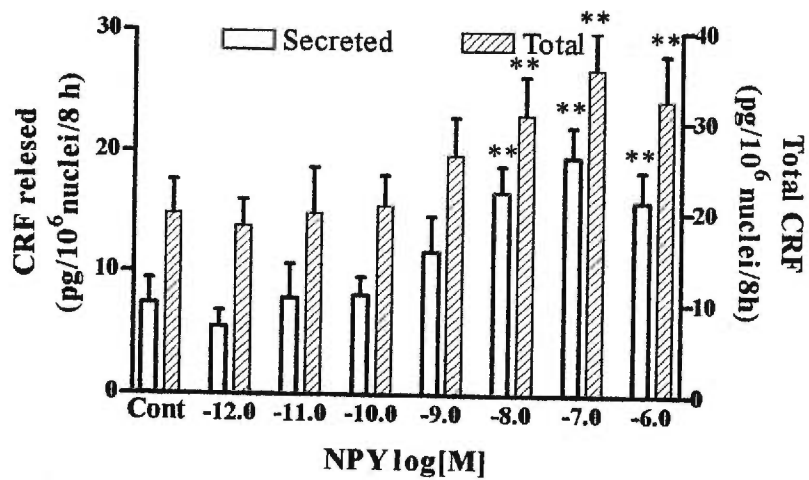
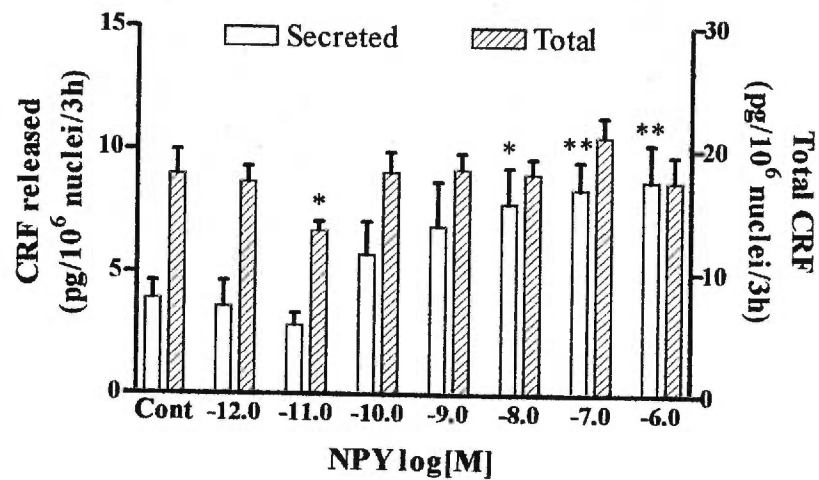


Fig. 1.

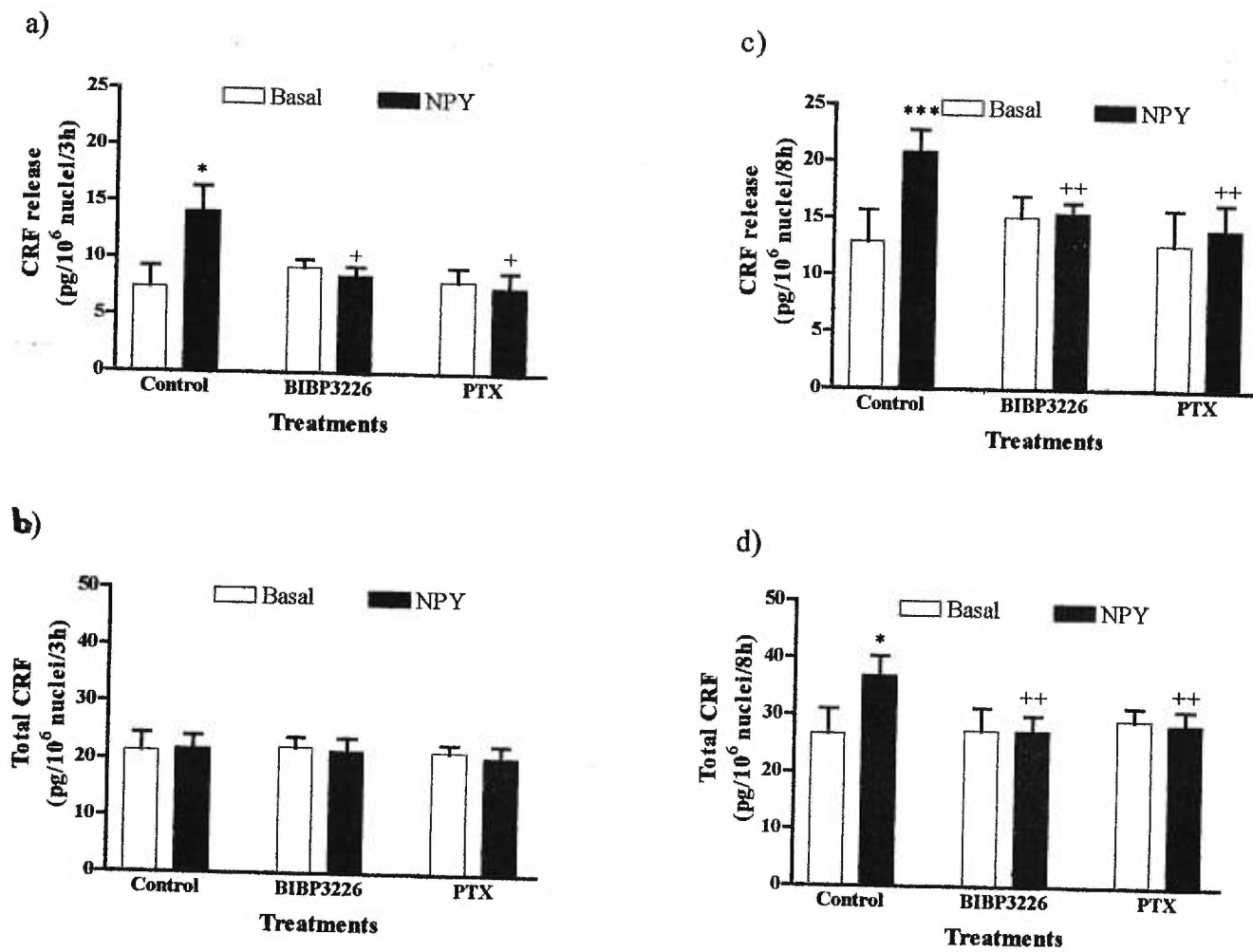


Fig.2.

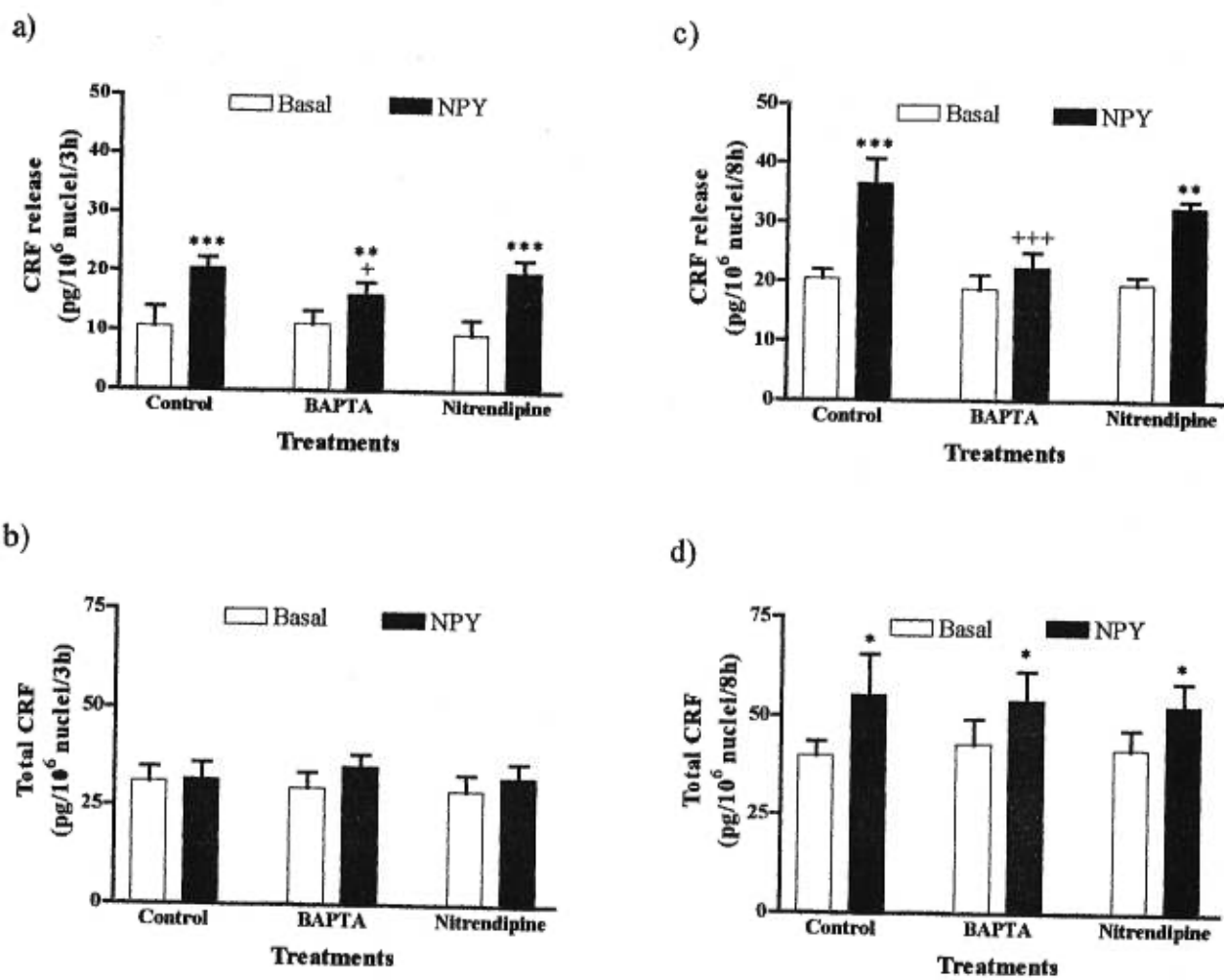


Fig.3.

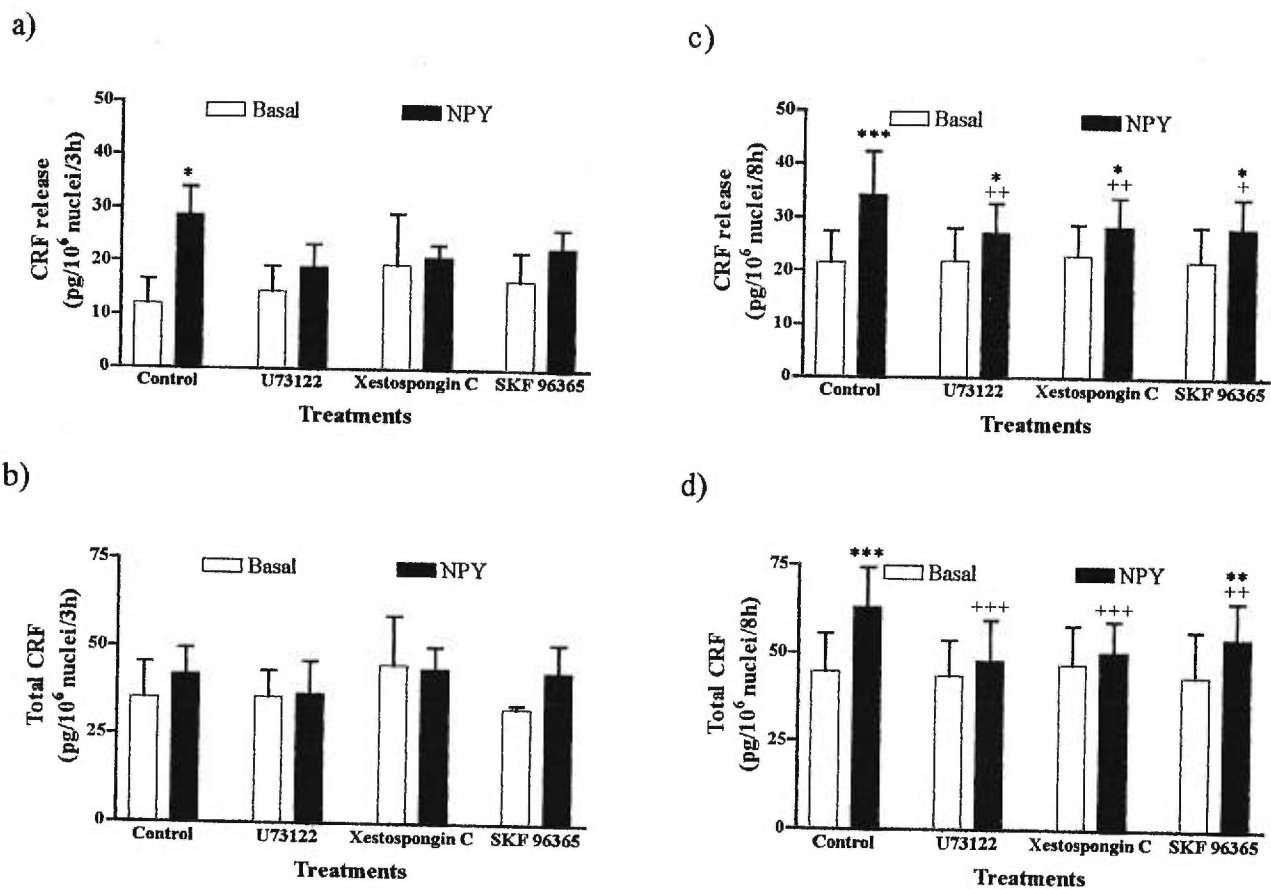


Fig.4.

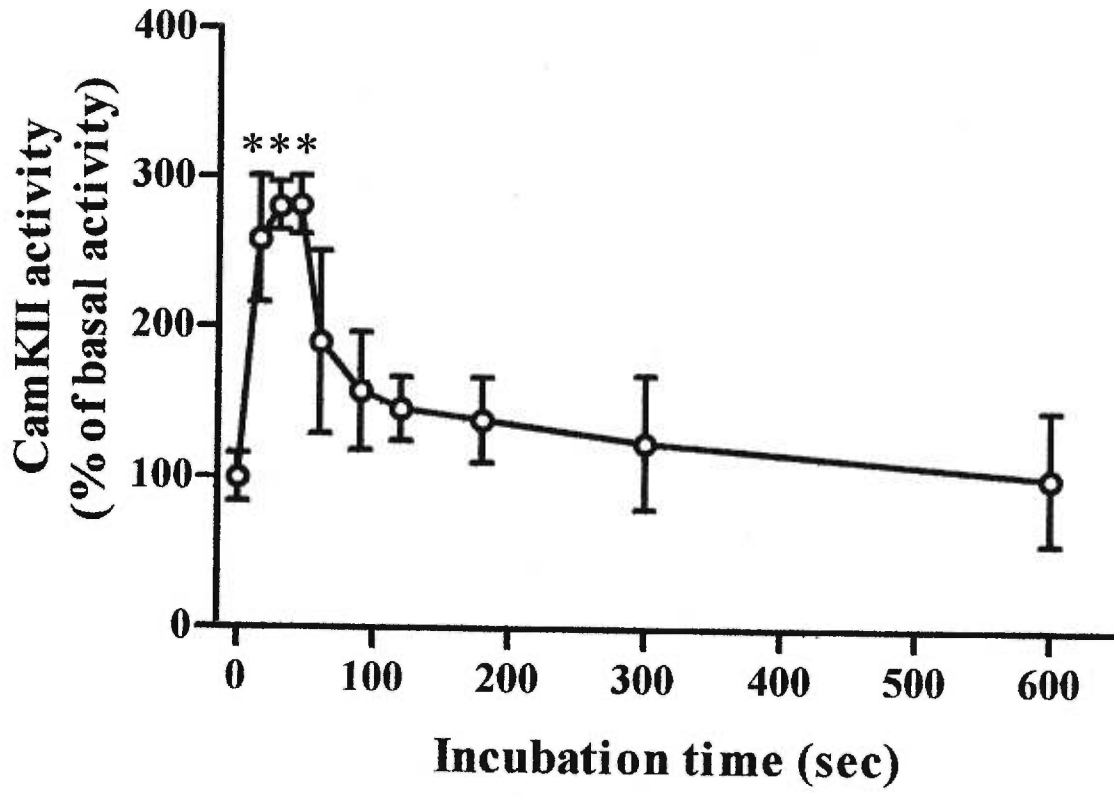


Fig.5.

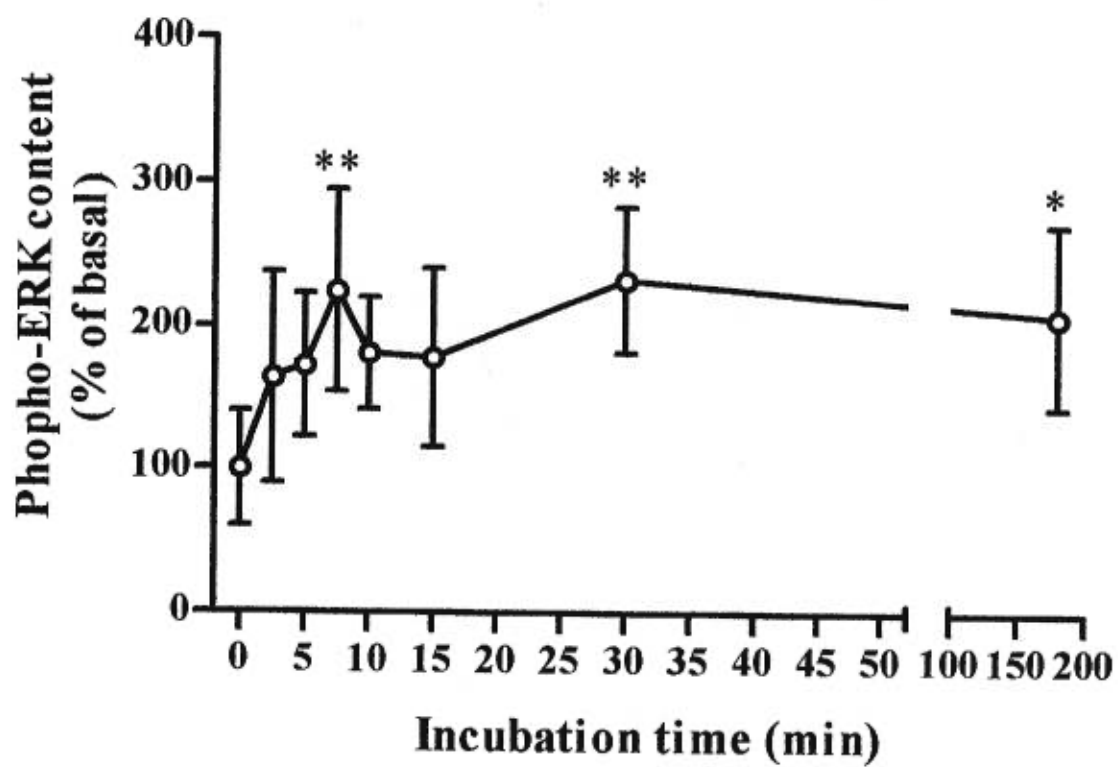


Fig. 6.

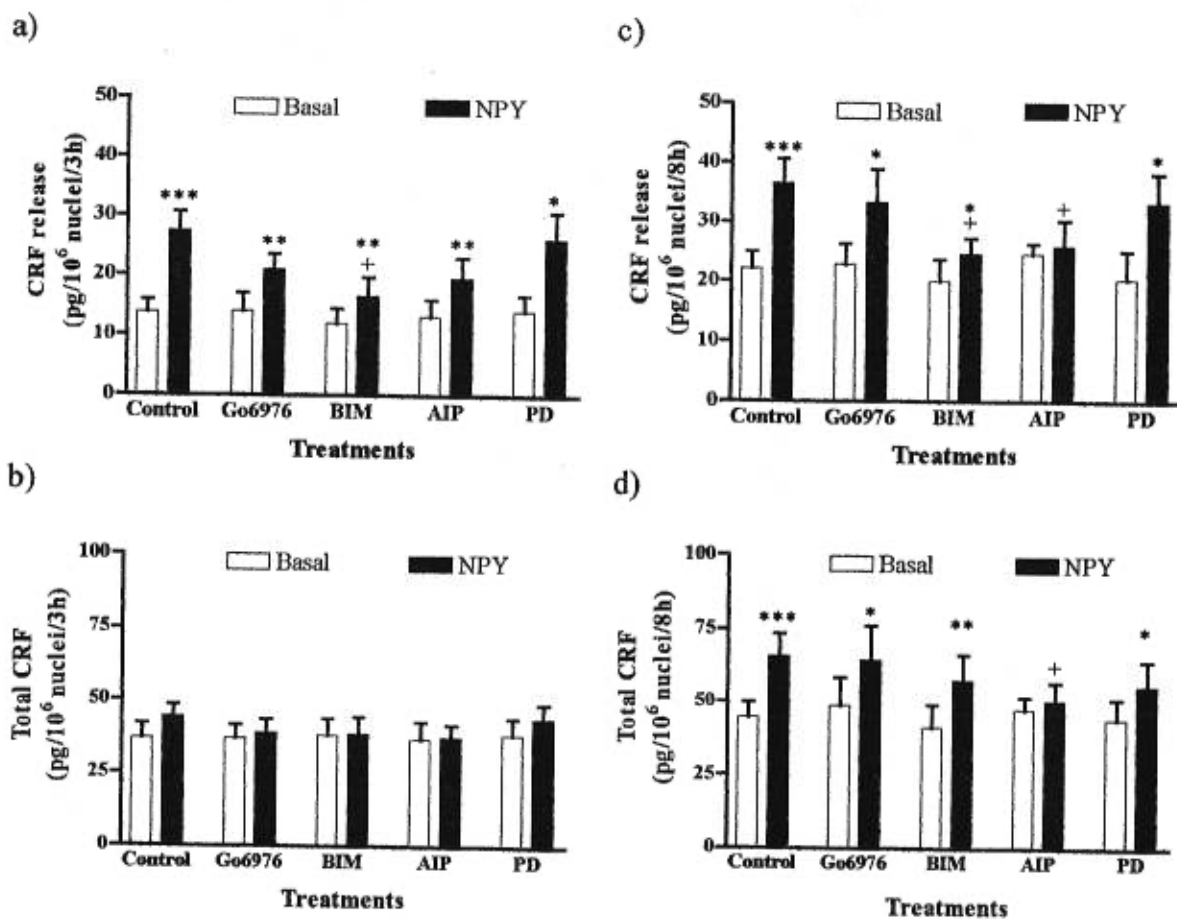


Fig. 7.

CHAPÎTRE SIXIÈME

DISCUSSION

Le syncytiotrophoblaste, de part sa situation stratégique au sein du placenta humain, est destiné à occuper une place importante dans les échanges materno-foetaux. L'accouchement, l'aboutissement ultime de la grossesse, est un exemple illustrant bien la complexité de cette communication tripartite au sein de laquelle le CRF joue un rôle clef (McLaen *et al.*, 1995). Conséquemment, l'étude des mécanismes généraux impliqués dans le contrôle de la synthèse et de la relâche de ce peptide revêt une importance certaine.

Le NPY, un peptide sécrété par le placenta, est un sécrétagogue du CRF (Petraglia *et al.*, 1989c). De plus, le NPY est pour l'instant le seul agoniste, interagissant exclusivement avec des récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques sensibles à la PTX (Michel *et al.*, 1998), impliqué dans le contrôle de la relâche du CRF (Petraglia *et al.*, 1989c). Ce caractère distinctif du NPY le rend particulièrement intéressant, puisqu'il suggère l'existence de nouvelles voies de contrôle de la synthèse et de la relâche du CRF par le syncytiotrophoblaste.

La présente discussion sera constituée de trois segments ; la caractérisation des récepteurs du NPY présents dans le syncytiotrophoblaste, la description des voies de signalisation impliquées dans les effets du NPY sur la synthèse et la relâche du CRF, et

plus globalement l'implication possible du NPY dans l'établissement des conditions favorables à l'accouchement. Cette discussion n'a pas pour objectif de reprendre celles des articles, toutefois, dans les situations où c'est nécessaire, les résultats seront expliqués d'avantage ou dans un contexte plus global.

La caractérisation des récepteurs du NPY présents dans le syncytiotrophoblaste,

Les résultats des études de liaison (premier article) montrent une importante asymétrie des sites de liaison pour le ^{125}I -NPY puisqu'ils sont localisés exclusivement sur les BBM. De plus, ces sites sont hétérogènes et composés d'une population mixte de récepteurs Y_1 et Y_3 . Une ségrégation aussi complète des sites de liaison syncytiotrophoblastiques pour une hormone est peu habituelle, mais rappelle celle des récepteurs M_1 muscariniques (Pavia *et al.*, 1997) et des récepteurs κ -opioïdiques (Porthe *et al.*, 1982) qui sont exprimés presque exclusivement sur les BBM, de même que celle des récepteurs β -adrénergiques (Whitsett, 1980) et des récepteurs AT_1 de l'angiotensine II (Jimenez *et al.*, 1996) qui sont presque exclusivement sur les BPM.

Au début de cette étude, seulement le sous-type Y_1 avait été cloné et caractérisé (Eva *et al.*, 1990, 1992, Herzog *et al.*, 1992 ; Krause *et al.*, 1992 ; Larhammar *et al.*, 1992). Ce récepteur, pour lequel l'ARN messager a été mis en évidence dans le placenta (Wharton *et al.*, 1993), se caractérise par une forte affinité pour des analogues du NPY ou du PYY, sur lesquels la glutamine présente à la position 34 a été remplacée par la proline présente à cette position sur le PP, par une perte progressive d'affinité pour les peptides dont la portion amino-terminale est tronquée, et par une faible affinité pour le PP (Larhammar *et al.*, 1992). Deux autres sous-types de récepteurs étaient bien acceptés, soient le sous-type Y_2 , caractérisé par sa tolérance aux délétions amino-terminales et par son absence d'affinité pour le [Leu³¹, Pro³⁴]NPY et le PP (Wahlestedt *et al.*, 1986) et le sous-type Y_3 , dépourvu d'affinité pour le PYY et le PP (Balasubramaniam *et al.*, 1990 ; Grundemar *et al.*, 1991 ; Wahlestedt *et al.*, 1992).

Comme c'est souvent le cas en physiologie et en pharmacologie, le clonage des sous-types Y_2 (Gerald *et al.*, 1995 ; Rose *et al.*, 1995), Y_4 (Lundell *et al.*, 1995 ; Bard *et al.*, 1995), Y_5 (Hu *et al.*, 1996) et Y_6 (Gregor *et al.*, 1996b ; Matsumoto *et al.*, 1996) chez l'humain, aurait pu venir brouiller les cartes. Heureusement, une incapacité pour le produit du gène y_6 humain de lier les membres de la famille du NPY l'exclut comme site de liaison possible (Gregor *et al.*, 1996b ; Matsumoto *et al.*, 1996 ; Rose *et al.*, 1997). Les sous-types Y_4 et Y_5 démontrent une forte affinité pour le PP, ce qui les exclut également comme sites de liaison possibles dans nos BBM. Donc, en accord avec la présente classification des sous-types de récepteurs du NPY (Gehlert, 1998 ; Michel *et al.*, 1998), les sites de liaison du NPY sur la membrane apicale syncytiotrophoblastique seraient à 55% du sous-type Y_1 et à 45% du sous-type Y_3 .

Les études fonctionnelles nous ont permis d'établir que ces sites de liaison étaient associés à des voies de signalisation aboutissant à l'activation de la CaMKII, des ERK_{1/2} et des PKCs (premier et troisième articles). Toutefois, pour l'activation des PLC- β et des PKCs, le seul axe ayant été exploré en ce sens, seul les récepteurs du NPY de type Y_1 semblent impliqués.

Nos résultats montrent clairement que le NPY et le PYY stimulent avec une même efficacité et une même puissance les phospholipases C- β . Quant à la nature des récepteurs responsables de l'activation de la phospholipase, le déplacement de la courbe concentration-effet d'environ 2 log vers la droite en présence de BIBP3226 (Rudolf *et al.*, 1994), un antagoniste non-peptidique du sous-type Y_1 totalement dépourvu d'affinité pour les nouveaux sous-types Y_2 , Y_3 , Y_4 et Y_5 (Jacques *et al.*, 1995 ; Wieland *et al.*, 1995b ; Doods *et al.*, 1996 ; Gerald *et al.*, 1996 ; Gehlert *et al.*, 1996), permet de suggérer que l'effet des deux peptides débute par une interaction avec le récepteur de sous-type Y_1 . L'antagoniste s'est d'ailleurs comporté comme prévu pour un antagoniste compétitif, puisque son effet est totalement surmontable dans la fenêtre de concentrations de NPY et PYY utilisée (Abounader *et al.*, 1994 ; Rudolf *et al.*, 1994 ; Jacques *et al.*, 1995 ; Wieland *et al.*, 1995b ; Doods *et al.*, 1996).

Les résultats présentés montrent également que le NPY et le PYY stimulent la phosphorylation de la MARCKS-psd, un substrat synthétique correspondant à la portion 145-169 de la MARCKS, c'est-à-dire contenant les trois sérines cibles des PKCs (Graff *et al.*, 1991 ; Heemskerk *et al.*, 1993). Ce peptide, de même que l'holoprotéine, ont d'abord été reconnus pour être des substrats exclusifs des PKCs conventionnelles et nouvelles (Stumpo *et al.*, 1989 ; Fujise *et al.*, 1994 ; Überall *et al.*, 1997). Toutefois, des études récentes montrent que la MARCKS-psd est le substrat des PKCs atypiques (Herget *et al.*, 1995 ; Douglas *et al.*, 1999) de même que de la PKC μ (Dieterich *et al.*, 1996). Une dernière étude propose que la MARCKS-psd est également la cible de la PRK-1 (Palmer *et al.*, 1996), une protéine kinase apparentée aux PKCs (Mellor et Parker, 1998). Les résultats de la présente étude, suggèrent fortement que le NPY et le PYY entraînent l'activation des PKCs, puisque la presque totalité de l'activité *MARCKS kinase* est inhibée suite à une incubation avec du calphostin C. Néanmoins, il faut considérer la possibilité qu'une petite portion de l'activité *MARCKS kinase* mesurée soit attribuable à la PRK-1.

La relation concentration-effet du NPY et du PYY sur l'activité des PKCs montrent également une dichotomie, le NPY étant plus efficace, tandis que le PYY démontre plus de puissance dans l'activation des PKCs. L'hypothèse la plus plausible, étant donnée que les deux peptides interagissent avec le même sous-type de récepteur et qu'ils activent la PLC- β avec la même efficacité et la même puissance, est que l'activation des PKCs par chacun des peptides dépend d'une ou de plusieurs voie(s) additionnelle(s). Il suffit donc d'imaginer que le récepteur de type Y₁ oscille entre des conformations, dont une serait couplée à l'activation des PLC- β . Le NPY aurait de l'affinité pour cette conformation, mais également pour une autre, notamment une conformation apte à activer la PI3-K. Cette dernière permettrait d'activer les PKCs avec une meilleure efficacité. Le PYY, pour sa part, aurait de l'affinité pour la conformation capable de stimuler les PLC- β , mais également pour une troisième conformation couplée à une voie de signalisation d'efficacité moindre à activer les PKCs.

Finalement, en ce qui a trait aux voies de signalisation, le NPY entraîne l'activation de la CaMKII et des ERK_{1/2}. La cinétique de l'activation de la CaMKII montre qu'elle est stimulée de façon transitoire et que le retour à l'activité de base est rapide. En comparaison, un influx calcique impliquant les L-VOCC (deuxième article), prend presque quatre fois plus de temps pour activer la kinase. La cause probable de cette différence se trouve probablement au niveau de la compartimentation, c'est-à-dire que la localisation de la kinase doit coïncider avec la localisation des sites de relâche sensibles à l'Ins(1,4,5)P₃ et non avec celle des L-VOCC. Il est effectivement connu que, contrairement à l'Ins(1,4,5)P₃ qui diffuse dans toute la cellule, le calcium a une mobilité restreinte due à la multitude des molécules, notamment, des protéines pouvant le fixer (Allbritton et Meyer, 1993). Abondant dans le même sens, l'entrée du calcium dans le cytosol par les L-VOCC présents sur la membrane apicale du syncytiotrophoblaste (Cimerikic *et al.*, 1998) devrait prendre un certain temps pour atteindre la CaMKII près des réserves de calcium, donc positionnée sous le collet d'actine. En effet, puisque la majorité des protéines intégrales se retrouvent sur l'extrémité des microvillosités, le calcium pour se rendre au cytosol, doit nécessairement traverser la botte et le collet d'actine avec ses charges négatives (Tang et Janmey, 1996 ; Lange, 1999). En conséquence, l'actine en jouant le rôle d'un échangeur de cations, devrait pouvoir ralentir suffisamment le flux de calcium pour permettre une activation graduelle plutôt que progressive de la CaMKII (Lin et Cantiello, 1993). En ce qui concerne la fin abrupte de l'activité de la kinase, qui d'ailleurs, est semblable pour les deux sources de calcium, il est connu que la CaMKII est rapidement désactivée par diverses phosphatases, dont une spécifique aux CaMK, qui est activé suite à l'activation de la CaMKII (Strack *et al.*, 1997 ; Kameshita *et al.*, 1999 ; Kitani *et al.*, 1999).

Les récepteurs et les mécanismes impliqués dans les effets du NPY n'ont pas été investigués de façon systématique pour toutes les voies de signalisation étudiée. Toutefois, en se basant sur les résultats de la présente étude et sur nos connaissances de la biochimie des récepteurs du neuropeptide Y, un schéma vraisemblable de la signalisation cellulaire découlant de l'interaction du NPY avec ces récepteurs à la surface du syncytiotrophoblaste peut être proposé (figure 9). Le NPY en interagissant

avec le récepteur de type Y_1 mènerait à l'activation des PLC- β , qui une fois activées, généreraient du DAG et de l'Ins(1,4,5) P_3 à partir du PtdIns(4,5) P_2 faisant parti des constituants des BBM (Berridge *et al.*, 1989). L'Ins(1,4,5) P_3 interagirait ensuite avec ses récepteurs positionnés sur les réserves intracellulaires. L'efflux de calcium qui résulterait de cette interaction (Lechleiter et Clapham, 1992) ou l'influx calcique capacitatif concomitant (Putney, 1986,1990) fourniraient le calcium qui peut activer la CamKII (Hanson et Schulman, 1992) et favoriser l'interaction des PKCs conventionnelles avec les phospholipides acides des membranes (Blobe *et al.*, 1994). Le diacylglycérol quant à lui, permettrait à ces PKCs conventionnelles de même qu'à des PKCs déjà amarrées, qu'elles soient conventionnelles ou nouvelles (Newton, 1995), de se déployer et de passer à la boucle d'activation débutant par une phosphorylation par la PDK-1 (Dutil *et al.*, 1998 ; Garcia-Paramio *et al.*, 1998). L'interaction du NPY avec ses récepteurs mènerait également à l'activation de la PI3-K, qui, une fois activée génèrerait du PtdIns(3,4) P_2 et du PtdIns(3,4,5) P_3 à partir du Ptd(4)P et du PtdIns(4,5) P_2 respectivement (Wymann et Pirola, 1998). Ces deux glycérophospholipides pourraient, par la suite, entraîner directement une activation partielle des PKCs nouvelles et atypiques (Nakanishi *et al.*, 1993 ; Toker *et al.*, 1994 ; Akimoto *et al.*, 1996) et *via* l'activation de la PDK-1, permettre de compléter l'activation des trois classes de PKCs (Chou *et al.*, 1998 ; Dutil *et al.*, 1998 ; Garcia-Paramio *et al.*, 1998 ; Le Good *et al.*, 1998). La PI3-K de même que les PKCs et la CamKII peuvent activer la voie des ERK $_{1/2}$. La première peut les activer suite à une action en amont de l'activation des *tyrosine kinases* cytosoliques (Lopez-Illasaca *et al.*, 1997), les deuxièmes en amont des *tyrosine kinases* cytosoliques (Lev *et al.*, 1995) ou par l'activation directe de Raf-1 (Kolch *et al.*, 1993) et la troisième par l'activation indirecte des ERK $_{1/2}$, mais en aval des MEK $_{1/2}$ (Muthalif *et al.*, 1996). Finalement, le calcium libéré suite à la production d'Ins(1,4,5) P_3 peut également *via* l'activation de *tyrosine kinases* cytosoliques tel Pyk-2, entraîner l'activation des ERK $_{1/2}$ (Lev *et al.*, 1995).

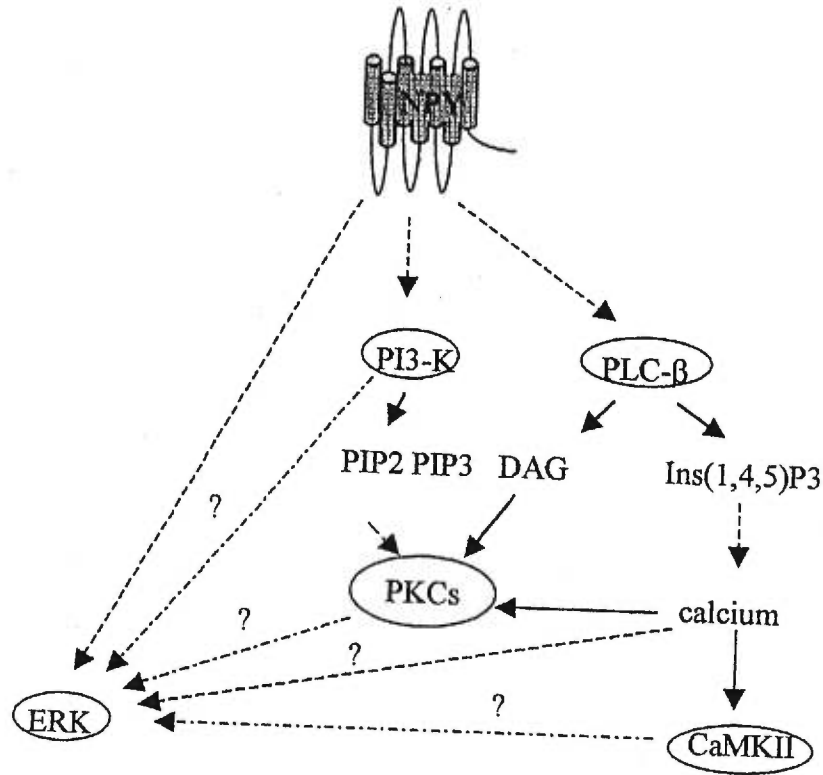


Figure 7. Schéma représentant les principales voies de signalisation associées ou proposées pour être associées aux récepteurs du NPY présents dans le syncytiotrophoblaste du placenta humain. Les abréviations sont les mêmes que dans le texte.

Effet stimulateur du neuropeptide Y sur la sécrétion du facteur de relâche de la corticostimuline par les cellules trophoblastiques du placenta humain

La grande majorité des études portant sur le contrôle de la synthèse ou de la relâche du CRF a été effectuée sur des cultures primaires de trophoblastes isolés à partir de placenta à terme (Petraglia *et al.*, 1987b, 1989a, 1990b ; Robinson *et al.*, 1988; Jones *et al.*, 1989; Riley et Challis, 1991 ; Karalis *et al.*, 1996). Les cytotrophoblastes du placenta humain à terme obtenus par digestion enzymatique peuvent être mis en culture pour quelques jours dans un milieu contenant du sérum. Dans ces conditions, ils se différencient morphologiquement et biochimiquement de façon spontanée afin de former des îlots syncytiaux selon un processus que l'on croit apparenté à la fusion des cytotrophoblastes *in vivo* (Hoshina *et al.*, 1985 ; Kliman *et al.*, 1986 ; Bax *et al.*, 1989). Toutefois, il est également établi que des cytotrophoblastes peuvent acquérir une compétence pour la synthèse et la sécrétion d'hormones, telle la hCG, sans pour autant se syncytialiser complètement (Feinman *et al.*, 1986).

Nos résultats démontrent que le NPY suite à son interaction avec le récepteur de type Y_1 augmente la quantité totale et la relâche du CRF par les cellules trophoblastiques à leur 4^e journée en culture *via* des protéines G sensibles à la PTX. L'originalité de ces résultats réside dans la mise en évidence d'une augmentation de la masse totale de CRF, puisque Petraglia *et al.* (1989c) n'ont démontré qu'une stimulation de la relâche du peptide par des cellules trophoblastiques en présence de NPY. Des études récemment publiées ont montré que le NPY induit la transcription du gène codant pour le CRF, ce qui suggère que l'augmentation de la masse totale de CRF est attribuable à une augmentation de la synthèse du peptide (Suda *et al.*, 1993 ; Sheriff *et al.*, 1997, 1998). La sensibilité à la PTX implique que des protéines G_i et/ou G_o , retrouvées dans le syncytiotrophoblaste (Kenton et Johnson, 1994; Petit *et al.*, 1995 ; El Mabrouk *et al.*, 1996) sont responsables des effets observés. Dans notre étude, l'effet du NPY semble pouvoir être subdivisé temporellement, soit un effet initial sur la relâche de granules préformés et un effet sur la synthèse se manifestant durant le temps d'incubation le plus

long. Toutefois, rien n'exclut que les voies de signalisation responsables de ces effets aient été activées dans les premières minutes d'incubation.

Les résultats présentés dans le troisième article montrent que contrairement à la synthèse, une partie importante de la relâche du CRF induite par le NPY est attribuable à une augmentation du niveau de calcium intracellulaire. Cette implication du calcium dans la relâche du CRF par le syncytiotrophoblaste avait d'ailleurs été proposée par trois études ayant utilisé de fortes concentrations de KCl pour induire la relâche du peptide (Thomson *et al.*, 1988 ; Sun *et al.*, 1994 ; Ni *et al.*, 1997). Toutefois, l'implication du calcium dans la relâche du CRF induite par le KCl n'a vraiment été confirmée, que lors de la présente étude, alors que la chélation du calcium intracellulaire ou l'antagonisme des L-VOCC contrecarre complètement l'effet du KCl sur la relâche du CRF (deuxième article). Les résultats montrent clairement toutefois que, contrairement à son effet sur la relâche du CRF induite par le KCl et le Bay K8644, la nitrendipine est incapable de contrer la relâche de CRF induite par le NPY (deuxième et troisième article), ce qui exclut les L-VOCC comme médiateur des effets du NPY.

Nos résultats démontrent l'implication des PLC- β et d'une mobilisation des réserves intracellulaires de calcium dans les effets du NPY sur la relâche du CRF (troisième article). Ces résultats sont en accord avec notre démonstration d'une activation des PLC- β par le NPY. Toutefois, les résultats obtenus en présence de U-73122 ou de xestospongine C montrent également que l'activité de la PLC- β , de même que la relâche du calcium, sont impliquées dans la stimulation de la synthèse du CRF par le NPY. L'effet du U-73122 pourrait être attribuable à une baisse de l'affinité du récepteur pour son ligand suite à l'inhibition de son interaction avec la PLC- β (Parker *et al.*, 1998). Toutefois, puisque l'inhibiteur des canaux sensibles à l'Ins(1,4,5)P₃ duplique les résultats obtenus avec l'aminostéroïde, nous sommes confiants d'être témoins d'une baisse de synthèse du CRF découlant de la baisse de la relâche de calcium. À première vue, ceci semble irréconciliable avec les résultats obtenus en préincubant les cellules en présence de BAPTA/AM, mais comme nous le verrons, les résultats obtenus à l'aide du

SKF 96365 (Merritt *et al.*, 1990 ; Mason *et al.*, 1991), un bloqueur non-sélectif des influx calciques (ROCC, SOCC et VOCC), une hypothèse plausible à ce sujet peut être avancée. En effet, l'utilisation du SKF 96365 initialement planifiée pour étudier le rôle des influx calciques capacitifs (ROCC ou SOCC) montrent qu'un influx de calcium est nécessaire pour une pleine activation de la relâche du CRF, mais qu'une inhibition de l'influx du cation n'a que très peu d'influence sur la synthèse du CRF. Le point commun entre le BAPTA/AM et le SKF 96365, qui les différentie du U-73122 et de la xestospongine C, est qu'ils entraînent une vidange des réserves intracellulaires de calcium. Ceci suggère que la vidange des réserves intracellulaires de calcium, pourrait induire l'activation d'une voie impliquée dans le contrôle de la synthèse de CRF.

Nos résultats montrent que le NPY stimule la CaMKII est qu'elle est impliquée dans l'effets stimulateur du NPY sur la relâche du CRF (troisième article). Ceci est en accord avec l'implication de la CaMKII dans la relâche et la synthèse de nombreuses autres hormones dans divers tissus et cellules (Wenham *et al.*, 1992 ; Prpic *et al.*, 1994 ; Cui *et al.*, 1996 ; Matovcik *et al.*, 1997 ; Waters *et al.*, 1998). Quant aux substrats impliqués, certaines protéines impliquées dans des étapes précoces du processus de sécrétion, telles la protéine associée aux microtubules de type 2 (MAP-2) et la synapsine 1, ont été ciblées (Easom, 1999 ; Matsumoto *et al.*, 1999). Par exemple, concernant la relâche de l'insuline, la phosphorylation de ces deux substrats entraîne une augmentation du nombre de granules prêts à être relâchés (Easom, 1999 ; Gromada *et al.*, 1999 ; Matsumoto *et al.*, 1999). Nos résultats montrent également que la CaMKII est impliquée dans l'effet stimulateur du NPY sur la synthèse du CRF. Ce qui est en accord avec l'implication de la CaMKII, *via* la phosphorylation de la protéine liant CRE (CREB), dans l'induction de la synthèse du CRF par le NPY déjà rapportée (Sheriff *et al.*, 1997,1998).

Finalement, nos résultats démontrent que des PKCs indépendantes du niveau de calcium intracellulaire sont impliquées dans les effets du NPY sur la relâche du CRF (troisième article). Ceci est en accord avec la stimulation des PKCs par le NPY et avec le rôle presque universel des PKCs dans le phénomène de la sécrétion (Rivera et Beaven,

1997). Étant donné la multitude de cibles de ces kinases au sein de l'appareil de sécrétion, il est difficile de pointer sans équivoque celle(s) responsable(s) des effets observés. Par exemple, l'actine (Apgar, 1991 ; Walaas, 1999) et la chaîne légère de la myosine (Choi *et al.*, 1994 ; Ludowyke *et al.*, 1996) sont deux protéines qui doivent subir une phosphorylation pour permettre aux granules d'atteindre la membrane plasmique. Un autre exemple est l'annexine 2, une protéine présente dans certains granules de sécrétion, qui doit subir une phosphorylation par les PKCs pour que la fusion avec la membrane ait lieu (Regnouf *et al.*, 1995 ; Delouche *et al.*, 1997). Les deux premières cibles seraient particulièrement importantes, puisque l'effet principal d'une activation des PKC dans un tissu sécréteur serait d'augmenter le pool de granules aptes à être sécrétés (Zawalich *et al.*, 1991 ; Rivera et Beaven, 1997). Bien qu'à première vue, ces résultats laissent croire que les PKCs conventionnelles ne sont pas compétentes à favoriser la relâche du CRF, il n'en est rien, puisque les PKCs conventionnelles sont impliquées dans l'augmentation de la relâche de ce peptide suite à un influx calcique par les L-VOCC (deuxième article).

En se basant sur les résultats de la présente étude, un scénario général des voies de signalisation impliquées dans la stimulation de la synthèse et de la relâche du CRF par le NPY dans le syncytiotrophoblaste, peut être proposé (figure 10). Selon ce scénario, le NPY en interagissant avec des récepteurs du sous-type Y_1 couplés à des protéines G sensibles à la PTX, entraîne l'activation de plusieurs voies de signalisation qui convergent vers le contrôle de la synthèse et de la relâche du CRF. L'une de ces voies, si ce n'est la principale, débute par l'activation des PLC- β . Cette activation, par la génération du DAG et de l'Ins(1,4,5)P₃, fournirait deux médiateurs intracellulaires importants pour le contrôle de la relâche et de la synthèse du CRF. L'Ins(1,4,5)P₃ généré entraînerait la libération de calcium des réserves intracellulaires et l'activation subséquente de la CaMKII. Cette kinase serait impliquée dans la phase initiale de la réponse, en phosphorylant des protéines impliquées dans le transport des granules contenant le CRF vers leurs lieux de relâche (Easom, 1999 ; Gromada *et al.*, 1999 ; Matsumoto *et al.*, 1999) et dans la phase tardive en initiant une augmentation de la

synthèse du CRF. Cette augmentation de la synthèse du CRF pourrait découler d'une phosphorylation directe de CREB (Sheriff *et al.*, 1997,1998). Le DAG libéré sous l'action des PLC- β entraînerait l'activation des PKCs nouvelles qui seraient, quant à elles, impliquées dans le transport des granules contenant le CRF de même que dans leur fusion avec la membrane (Rivera et Beaven, 1997). Une autre action du DAG pourrait être l'activation des ROCC également impliqués dans les effets du NPY sur la synthèse et la relâche du CRF. Les SOCC activés suite à la libération du calcium intracellulaire pourraient également être impliqués.

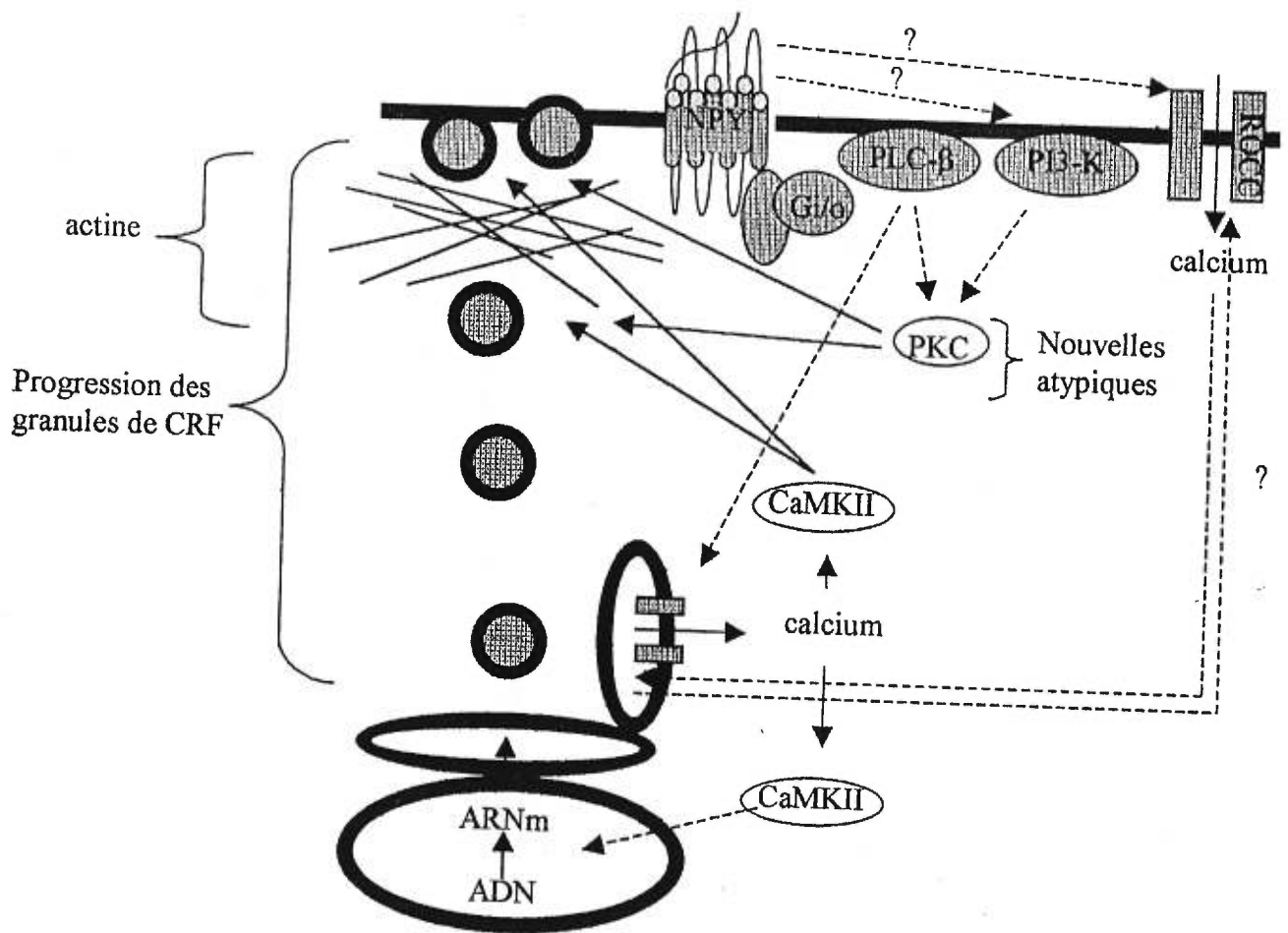


Figure 10. Représentation schématique de la régulation par le NPY de la synthèse et de la relâche du CRF par le syncytiotrophoblaste du placenta humain. Les abréviations sont les mêmes que dans le texte.

Un rôle pour le NPY dans l'établissement des conditions favorables à la parturition

Nos résultats permettent de suggérer que le NPY joue un rôle dans le contrôle de la synthèse et de la relâche du CRF par le placenta. Par le fait même, il serait impliqué dans la maturation du fœtus et dans l'établissement des conditions favorables à l'accouchement. Ces effets du NPY pourraient débuter très tôt durant la grossesse, c'est-à-dire lorsque le ratio NPY/progestérone est maximum (Tulchinsky *et al.*, 1972 ; Petraglia *et al.*, 1989b) Ainsi sans le frein apposé par le stéroïde placentaire, le neuropeptide se retrouvant dans la chambre intervilluse pourrait induire la synthèse et la relâche du CRF par le syncytiotrophoblaste. Le CRF ainsi produit pourrait atteindre la circulation fœtale *via* les veines ombélicales (Goland *et al.*, 1986,1988 ; Sasaki *et al.*, 1987b) et stimuler l'axe HHS fœtal (Waddell, 1993). Ainsi, pourrait débuter les boucles amplificatrices impliquant les glucocorticoïdes, l'ocytocine et les prostaglandines, et en parallèle, le NPY continuerait son action de sécrétagogue. Ces boucles amplificatrices étant responsables en grande partie de la maturation fœtale et se terminant inévitablement par l'accouchement, le NPY aurait ainsi, un rôle parmi les instigateurs de ce processus complexe.

Toutefois, le rôle prépondérant que devrait avoir le NPY dans la relâche du CRF, en périodes de stress physique ou psychosocial (Mormede *et al.*, 1990 ; Zukowska-Grojec, 1995), permet de lui proposer un rôle important dans l'étiologie des accouchements précoces. La modulation de la relâche du CRF ne serait pas la seule avenue empruntée par le NPY pour parvenir à cette fin, puisqu'il entraîne également la relâche de l'activine, un stimulateur de la production des prostaglandines, donc de la contraction utérine (Petraglia *et al.*, 1993b).

En conclusion, cette étude est une bonne introduction aux voies de signalisation associées aux récepteurs du NPY dans les cellules trophoblastiques du placenta humain. Elle a permis de tirer les grandes lignes des voies pouvant relier des récepteurs, couplés aux protéines G sensibles à la PTX, à la synthèse et la relâche du CRF. Elle ouvre les portes sur d'intéressantes études pouvant mettre en place la nature spatio-temporelle des interactions décrites dans cette thèse. Notamment, des études seraient nécessaires afin de déterminer quel(s) sous-type(s) de récepteurs du NPY sont impliqués dans la stimulation

des CaMKII et des ERKs. Dans la même veine, une approche utilisant des anticorps neutralisants devrait permettre l'identification des isotypes de phospholipases C- β impliqués dans les effets du NPY sur la synthèse et la relâche du CRF. De plus, la synthèse du CRF pourrait être adressé directement par la quantification de l'ARN messager du peptide. Évidemment, bien qu'il soit tentant de conclure sur l'importance relative de cette recherche, nous devons attendre la mise en évidence *in vivo* d'une régulation de la relâche du CRF par le NPY, et encore plus fondamentale, la consolidation du rôle moteur du CRF dans les événements menant à l'accouchement. Mais nul doute que cette étude aura permis de mettre en évidence la complexité de la signalisation associée aux récepteurs du NPY de même que celle associée aux fluctuations de la concentration intracellulaire de calcium.

BIBLIOGRAPHIE

- Abounader, R., Villemure, J.G., Hamel, E.** Characterization of neuropeptide Y (NPY) receptors in human cerebral arteries with selective agonists and the new antagonist BIBP 3226. *Br J Pharmacol*, (1994), 116:2245-2250.
- Adler, G.K., Smas, C.M., Fiandaca, M., Frim, D.M., Majzoub, J.A.** Regulated expression of the human corticotropin-releasing hormone gene by cyclic AMP. *Mol Cell Endocrinol*, (1990), 70: 165-174.
- Adler, G.K., Rosen, L.B., Fiandaca, M., Majzoub, J.A.** Protein kinase-C activation increases the quantity and poly(A) tail length of corticotropin-releasing hormone messenger RNA in NPLC cells. *Mol Endocrinol*, (1992), 6:476-484.
- Adrian, T.E., Allen, J.M., Bloom, S.R., Ghatwari, M.A., Rossor, M.M., Roberts, G.H., Crow, T., Tatemoto, K., Polak, J.M.** Neuropeptide Y distribution in the human brain. *Nature*, (1983), 306:584-586.
- Adrian, T.E., Allen, J.M., Tatemoto, K., Crow, T., Bloom, S.R., Allen, J., Novotny, J., Martin, J., Heinrich, G.** Molecular structure of mammalian neuropeptide Y: analysis by molecular cloning and computer-aided comparison with crystal structure of avian homolog. *Proc Natl Acad Sci USA*, (1987), 84:2532-2536.
- Akimoto, K., Takahashi, R., Moriya, S., Nishioka, N., Takayanagi, J., Kimura, K., Fukui, Y., Osada, S., Mizuno, K., Hirai, S., Kazlauskas, A., Ohno, S.** EGF or PDGF receptors activate atypical PKC α through phosphatidylinositol 3-kinase. *EMBO J*, (1996), 15:788-798.

- Alblas, J., van Corven, E.J., Hordijk, P.L., Milligan, G., Moolenaar, W.H.** Gi-mediated activation of the p21 ras-mitogen-activated protein kinase pathway by alpha 2-adrenergic receptors expressed in fibroblasts. *J Biol Chem*, (1993), 268:22235-22238.
- Alessi, D.R., Deak, M., Casamayor, A., Caudwell, F.B., Morrice, N., Norman, D.G., Gaffney, P., Reese, C.B., MacDougall, C.N., Harbison, D., Ashworth, A., Bownes, M.** 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK-1): structural and functional homology with the *Drosophila* DSTPK61 kinase. *Curr Biol*, (1997), 7:776-789.
- Allbritton, N.L., Meyer, T.** Localized calcium spikes and propagating calcium waves. *Cell Calcium*, (1993), 14:691-697.
- Allen, J.M., Bircham, P.M.M., Edwards, A.V., Tatemoto, K., Bloom, S.R.** Neuropeptide Y (NPY) reduces myocardial perfusion and inhibits the force of contraction of isolated perfused rabbit heart. *Regul Pept*, (1983a), 6:247-253.
- Allen, Y.S., Adrian, T.E., Allen, J.M., Tatemoto, K., Crow, T., Bloom, S.R., Polak, J.M.** Neuropeptide Y distribution in the rat brain. *Science*, (1983b), 221:877-879.
- Allen, J.M., Rodrigo, J., Yeats, J.C., Savage, A.P., Polak, J.M., Bloom, S.R.** Vascular distribution of neuropeptide Y (NPY) and effect on blood pressure. *Clin Exp Theory Pract*, (1984a), 6:1879-1882.
- Allen, J.M., Polak, J.M., Rodrigo, J., Darcy, K., Bloom, S.R.** Localisation of neuropeptide Y in nerves of the rat cardiovascular system and the effect of 6-hydroxydopamine. *Cardiovasc Res*, (1985), 19:570-577.
- Andrew, T.C., Dale, E.M., Pieter, B.M., Timmermans, W.M.** Pharmacological characteristics of receptor-operated and potential-operated Ca²⁺ calcium channels in rat aorta. *Eur J Pharmacol*, (1986), 127:1-8.

- Auger, K.R., Serunian, L.A., Soltoff, S.P., Libby, P., Cantley, L.** PDGF-dependent tyrosine phosphorylation stimulates production of novel polyphosphoinositides in intact cells. *Cell*, (1989), 57:167-175.
- Balasubramaniam, A., Sheriff, S., Rigel, D.F., Fischer, J.E.** Characterization of neuropeptide Y binding sites in rat cardiac ventricular membranes. *Peptides*, (1990), 11:545-550.
- Baldwin, J.M.** The probable arrangement of the helices in G protein coupled receptors. *EMBO J*, (1993), 12:1693-1703.
- Ball, H.J., Walker, M.W., Herzog, H.** Multiple promoters regulate tissues-specific expression of the human NPY-Y1 receptor gene. *J Biol Chem*, (1995), 270:27272-27276.
- Ballesta, J., Polak, J.M., Bloom, S.R.** The nerves of juxtaglomerular apparatus of man and other mammals contain the potent peptide NPY. *Histochemistry*, (1984), 80:483-485.
- Bard, J.A., Walker, M.W., Branchek, T.A., Weinshank, R.L.** Cloning and functional expression of a human Y₄ subtype receptor for pancreatic polypeptide, neuropeptide Y and peptide YY. *J Biol Chem*, (1995), 270:26762-26765.
- Bark, I.C., Wilson, M.C.** Regulated vesicular fusion in neurons: snapping together the details. *Proc Natl Acad Sci USA*, (1994), 91:4621-4624.
- Barnea, E.R., Ashkenazy, R., Sarne, Y.** The effect of dynorphin on placental pulsatile hCG secretion *in vitro*. *J Clin Endocrinol Metab*, (1991a), 73:1093-1098.

- Barnea, E.R., Ashkenazy, R., Tal, Y., Kol, S., Sarne, Y.** Effect of β -endorphin on human chorionic gonadotrophin secretion by placental explants. *Human Reprod*, (1991b), 6:1327-1331.
- Barreca, A., Valli, B., Cesarone, A., Arvigo, M., Balasini, M., Battista La Sala, G., Garrone, S., Minuto, F., Giordano, G.** Effects of the neuropeptide Y on estradiol and progesterone secretion by human granulosa cells in culture. *Fertil Steril*, (1998), 70:320-325.
- Barritt, G.J., Gregory, R.B.** An evaluation of strategies available for the identification of GTP-binding proteins required in intracellular signalling pathways. *Cell Signal*, (1997), 9: 207-218.
- Barron, W.M., Mujais, S.K., Zinaman, M., Bravo, E.L., Lindheimer, M.D.** Plasma catecholamine responses to physiologic stimuli in normal human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, (1986), 154:80-84.
- Batzer, A.G., Rotin, D., Urena, J.M., Skolnik, E.Y., Schlessinger, J.** Hierarchy of binding sites for Grb2 and Shc on the epidermal growth factor receptor. *Mol Cell Biol*, (1994), 14:5192-5201.
- Bauer, M.K., Harding, J.E., Bassett, N.S., Breier, B.H., Olivier, M.H., Gallaher, B.H., Evans, P.C., Woodall, S.M., Gluckman, P.D.** Fetal growth and placental function. *Mol Cell Endocrinol*, (1998), 115-120.
- Bax, C.M.R., Ryder, T.A., Mobberley, M.A., Tyms, A.S., Taylor, D.L., Bloxam, D.L.** Ultrastructural changes and immunocytochemical analysis of human placental trophoblast during short-term culture. *Placenta*, (1989), 10:179-194.
- Beck, T., Schweikhart, G., Stolz, E.** Immunohistochemical location of hPL, SP1 and β -hCG in normal placentas of varying gestational age. *Arch Gynecol*, (1986), 239:63-74.

- Beck-Sickinger, A.G., Jung, G.** Structure-activity relationships of neuropeptide Y analogues with respect to Y₁ and Y₂ receptors. *Biopolymers (Peptide Science)*, (1995), 37:123-142.
- Beier, H.M., Beier-Hellwig, K.** Molecular and cellular aspects of endometrial receptivity. *Hum Reprod Update*, (1998), 4:448-458.
- Bélisle, S., Guevin, J.F., Bellabarba, D., Lehoux, J.G.** Luteinizing hormone-releasing hormone binds to enriched human placental membranes and stimulates *in vitro* the synthesis of bioactive human chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab*, (1984), 59:119-126.
- Bélisle, S., Lehoux, J.G., Bellabarba, D., Gallo-Payet, N., Guevin, J.F.** Dynamics of LHRH binding to human term placental cells from normal and anencephalic gestations. *Mol Cell Endocrinol*, (1987), 49:195-202.
- Bélisle, S., Petit, A., Bellabarba, D., Escher, E., Lehoux, J.G., Gallo-Payet, N.** Ca²⁺, but not membrane lipid hydrolysis, mediates human chorionic gonadotropin production by luteinizing hormone-releasing hormone in human term placenta. *J Clin Endocrinol Metab*, (1989), 69:117-121.
- Benedetto, C., Petraglia, F., Marozio, L., Chiarolini, L., Florio, P., Genazzani, A.R., Massobrio, M.** Corticotropin-releasing hormone increases prostaglandin F_{2α} activity on human myometrium *in vitro*. *Am J Obstet Gynecol*, (1994), 171: 126-131.
- Benes, C., Poitout, V., Marie, J.C., Martin-Perez, J., Roisin, M.P., Fagard, R.** Mode of regulation of the extracellular signal-regulated kinases in the pancreatic beta-cell line MIN6 and their implication in the regulation of insulin gene transcription. *Biochem J*, (1999), 340:219-225.

- Bernirschke, K., Kaufmann, P.** Chapter 3 : Basic structure of the villous trees. In : Pathology of the human placenta. Springer Verlag, New York, (1990), pp22-70.
- Berridge, M.J., Irvine, R.F.** Inositol phosphates and cell signalling. *Nature*, (1989), 341:197-205.
- Berridge, M.J.** Inositol phosphates and calcium signalling. *Nature*, (1993), 361:315-325.
- Berridge, M.J.** Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Physiol*, (1997), 499:291-306.
- Berthold, M., Bartfai, T.** Modes of peptide binding in G protein-coupled receptors. *Neurochem Res*, (1997), 22:1023-1031.
- Bezprozvanny, I., Watras, J., Ehrlich, B.E.** Bell-shaped calcium response curves of Ins(1,4,5)P₃- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature*, (1991), 351:751-754.
- Billah, M.M., Anthes, J.C.** The regulation and cellular functions of phosphatidylcholine hydrolysis. *Biochem J*, (1990), 269:281-291.
- Billingsley, S.A., Wooding, F.B.P.** An immunogold, cryoultrastructural study of sites of synthesis and storage of chorionic gonadotropin and placental lactogen in human syncytiotrophoblast. *Cell Tissue Res*, (1990), 261:375-382.
- Birnbaumer, L., Birnbaumer, M.** Signal transduction by G proteins, *J Receptor Signal Transduct Res*, (1995), 15:213-252.

Bischoff, A., Avramidis, P., Erdbrügger, W., Münter, K., Michel, M.C. Receptor subtypes Y_1 and Y_5 are involved in the renal effects of neuropeptide Y. *Br J Pharmacol*, (1997), 120:1335-1343.

Bisits, A., Madsen, G., McLean, M., O'Callaghan, S., Smith, R., Warwick, G. Corticotropin-releasing hormone: a biochemical predictor of preterm delivery in a pilot randomized trial of the treatment of preterm labor. *Am J Obstet Gynecol*, (1998), 178:862-866.

Blaukat, B., Ivankovic, I.I., Grönroos, E., Dolfi, F., Tokiwa, G., Vuori, K., Dikic, I. Adaptator proteins Grb2 and Crk couple Pyk2 with activation of specific mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem*, (1999), 274:14893-14901.

Blumenfeld, Z., Jaffe, R.B. Hypophysiotropic and neuromodulatory regulation of adrenocorticotropin in the human fetal pituitary gland. *J Clin Invest*, (1986), 78:288-294.

Böhm, S.K., Grady, E.F., Bunnett, N.W. Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. *Biochem J*, (1997), 322:1-18.

Boime, I. Human placental hormone production is linked to the stage of trophoblast differentiation. *Trophoblast Res*, (1991), 5:57-60.

Bokoch, G.M., Gilman, A.G. Inhibition of receptor-mediated release of arachidonic acid by pertussis toxin. *Cell*, (1984), 39:301-308.

Bootman, M.D., Berridge, M.J. Sub-cellular Ca^{2+} signals underlying waves and graded response in HeLa cells. *Current Biol*, (1996), 6:885-865.

Bootman, M.D., Niggli, E., Berridge, M.J., Lipp, P. Imaging the hierarchical Ca^{2+} signalling system in HeLa cells. *J Physiol*, (1997), 499:307-314.

Borowsky, B., Walker, M.W., Bard, J., Weinshank, R.L., Laz, T.M., Vaysse, P., Branchek, T.A., Gerald, C. Molecular biology and pharmacology of multiple NPY Y5 receptor species homologs. *Regul Pept*, (1998), 75-76:45-53.

Böttcher, G., Sjöberg, J., Ekman, R., Håkanson, R., Sundler, F. Peptide YY in the mammalian pancreas: immunocytochemical localization and immunochemical characterization. *Regul Pept*, (1993), 43:115-130.

Boulay, G., Zhu, X., Peyton, M., Jiang, M., Hurst, R., Stefani, E., Birnbaumer, L. Cloning and expression of a novel mammalian homolog of *Drosophila* transient receptor potential (Trp) involved in calcium entry secondary to activation of receptors coupled by the Gq class of G protein. *J Biol Chem*, (1997), 272:29672-29680.

Bouvier, M., Moffett, S., Loisel, T.P., Mouillac, B., Hébert, T.E., Chidiac, P. Palmitoylation of G-protein-coupled receptors: a dynamic modification with functional consequences. *Biochem Soc Trans*, (1994), 23:1994-1998.

Boyd, J.D., Hamilton, W.J. Electron microscopic observations on the cytotrophoblast contribution to the syncytium in the human placenta. *J Anat*, (1966), 100:535-548.

Boyd, J.D., Hamilton, W.J., Boyd, C.A.R. The surface of the syncytium of the human chorionic villus. *J Anat*, (1968), 102:553-563.

Boyd, C.A., Chipperfield, A.R., Steele, L.W. Separation of the microvillous (maternal) from the basal (fetal) plasma membrane of human term placenta: methods and physiological significance of marker enzyme distribution. *J Dev Physiol*, (1979), 1:361-377.

Boyd, P.A. Quantitative structure of the normal human placenta from 10 weeks of gestation to term. *Early Hum Dev*, (1984), 9:297-307.

- Boyer, J.L., Waldo, G.L., Harden, T.K.** $\beta\gamma$ -subunit activation of G-protein-regulated phospholipase C. *J Biol Chem*, (1992), 267:25451-25456.
- Braun, A.P., Schulman, H.** The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu Rev Physiol*, (1995), 57:417-445.
- Braunstein, G.D., Rasor, J., Danzer, H., Adler, D., Wade, M.E.** Serum human chorionic gonadotropin levels throughout normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, (1976), 126:678-681.
- Brooks, A.N., Hagan, D.M., Howe, D.C.** Neuroendocrine regulation of pituitary-adrenal function during fetal life. *Eur J Endocrinol*, (1996), 135:153-165.
- Broomé, M., Hökfelt, T., Terenius, L.** Peptide YY (PYY)-immunoreactive neurons in the lower brain stem and spinal cord of rat. *Acta Physiol Scand*, (1985), 125:349-352.
- Brown, N.A., McAllister, G., Weinberg, D., Milligan, G., Seabrook, G.R.** Involvement of G-protein α_{i1} subunits in activation of G-protein gated inward rectifying K^+ channels (GIRK1) by NPY1 receptors. *Br J Pharmacol*, (1995), 116:2346-2348.
- Bryant-Greenwood, G.D., Schwabe, C.** Human relaxins: chemistry and biology. *Endocr Rev*, (1994), 15:5-26.
- Bryant-Greenwood, G.D.** The extracellular matrix of the human fetal membranes: structure and function. *Placenta*, (1998), 19:1-19.

Burd, J.M., Davidson, J., Weightman, D.R., Baylis, P.H. Evaluation of enzyme inhibitors of pregnancy associated oxytocinase: application to the measurement of plasma immunoreactive oxytocin during human labor. *Acta Endocrinol*, (1987), 114:458-464.

Burch, R.M., Luini, A., Axelrod, J. Phospholipase A2 and phospholipase C are activated by distinct GTP-binding proteins in response to alpha 1-adrenergic stimulation in FRTL5 thyroid cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, (1986), 83:7201-7205.

Burgess, T.L., Kelly, R.B. Constitutive and regulated secretion of protein. *Ann Rev Cell Biol*, (1987), 3:243-293.

Burgos, M.H., Rodrigez, E.M. Specialized zones in the trophoblast of the human term placenta. *Am J Obstet Gynecol*, (1966), 96:342-356.

Burgoyne, R.D., Morgan, A. Calcium sensors in regulated exocytosis. *Cell Calcium*, (1998), 24:367-376.

Burton, G.J. The fine structure of the human placental villus as revealed by scanning electron microscopy. *Scanning Microscopy*, (1987), 1:1811-1828.

Burton, G.J., Tham, S.W. Formation of vasculo-syncytial membranes in the human placenta. *J Dev Physiol*, (1992), 18:43-47.

Burton, P.J., Waddell, B.J. Dual function of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in placenta: modulating placental glucocorticoid passage and local steroid action. *Biol Reprod*, (1999), 60:234-240.

Burton, G.J., Watson, A.L. The structure of the human placenta: implications for Initiating and defending against virus infections. *Rev Med Virol*, (1997), 7:219-228.

Burton, G.J., Jauniaux, E., Watson, A.L. Maternal arterial connections to the placental intervillous space during the first trimester of human pregnancy: the boyd collection revisited. *Am J Obstet Gynecol*, (1999), 181:718-724.

Cadioux, A., Benckroun, M.T., St-Pierre, S., Fournier, A. Bronchoconstrictor action of neuropeptide Y (NPY) in isolated guinea pig airways. *Neuropeptides*, (1989), 13:215-219.

Cadioux, A., Benckroun, M.T., Fournier, A., St-Pierre, S. Pharmacological actions of neuropeptide Y and peptide YY in rat colon. *Ann NY Acad Sci*, (1990), 611:372-375.

Campbell, E.A., Linton, E.A., Wolfe, C.D.A., Scraggs, P.R., Jones, M.T., Lowry, P.J. Corticotropin-releasing hormone concentrations during pregnancy and parturition. *J Clin Endocrinol Metab*, (1987), 64:1054-1059.

Camps, M., Carozzi, A., Schnabel, P., Scheer, A., Parker, P.J., Gierschik, P. Isozyme-selective stimulation of phospholipase C- β 2 by G protein $\beta\gamma$ -subunits, *Nature*, 360:684-689.

Cantle, S.J., Kaufmann, P., Luckhardt, M., Schweikhart, G. Interpretation of syncytial sprouts and bridges in the human placenta. *Placenta*, (1987), 8:221-234.

Carr, B.R., Parker, C.R., Madden, J.D., MacDonald, P.C., Porter, J.C. Maternal plasma adrenocorticotropin and cortisol relationships throughout human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, (1981), 139:416-422.

Carsten, M.E. Calcium accumulation by human uterine microsomal preparations: effects of progesterone and oxytocin. *Am J Obstet Gynecol*, (1979), 133:598-601.

Carter, J.E. Morphologic evidences of syncytial formation from the cytotrophoblastic cells. *Obstet Gynecol*, (1964), 23:647-656.

Casey, M.L., MacDonald, P.C. Biomolecular processes in the initiation of parturition: decidual activation. *Clin Obstet Gynecol*, (1988), 31:533-552.

Caspo, A.I., Pulkkinen, M.O., Ruttner, B., Savauge, J.P., Wiest, W.G. The signifiante of the human *corpus luteum* in pregnancy maintenance. I. Preliminary studies. *Am J Obstet Gynecol*, (1972), 1061-1075.

Call, G.B., Wolfe, M.W. Gonadotropin-releasing hormone activates the equine luteinizing hormone beta promoter through a protein kinase C/mitogen-activated protein kinase pathway. *Biol Reprod*, (1999), 61:715-723.

Castan, I., Valet, P., Voisin, T., Quindeau, N., Laburthe, M., Lafontan, M. Identification and functional studies of a specific peptide-YY-preferring receptor in dog adipocytes. *Endocrinology*, (1992), 131:1970-1976.

Castellucci, M., Scheper, M., Scheffen, I., Celona, A., Kaufmann, P. The development of the human placental villous tree. *Anat Embryol*, (1990), 181:117-128.

Catt, K.J., Dufau, M.L., Vaitukaitis, J.L. Appearance of hCG in pregnancy plasma following the initiation of implantation of the blastocyst. *J Clin Endocrinol Metab*, (1975), 40:537-540.

Cazaubon, S., Bornancin, F., Parker, P.J. Threonine-497 is a critical site for the permissive action of protein kinase C β . *Biochem J*, (1994), 301:443-448.

Chakravorty, A., Mesiano, S., Jaffe, R.B. Corticotropin-releasing hormone stimulates P450 17 α -hydroxylase/17,20-lyase in human fetal adrenal cells via protein kinase C. *J Clin Endocrinol Metab*, (1999), 84:3732-3738.

Challis, J.R.G., Lye S.J. Parturition. In: Knobil, E.m, Neill, J.D. (eds) The physiology of reproduction. 2 ed. Raven Press, New York (1994).

Challis, J.R.G., Lye S.J., Gibb, W. Prostaglandins and parturition. *Ann NY Acad Sci*, (1997), 828:254-267.

Chan, E.C., Smith, R., Levin, Y., Brimsmead, M.W., Zhang, H.P., Cubis, J., Thornton, K., Hurt, D. Plasma corticotropin-releasing hormone, β -endorphin and cortisol inter-relationship during human pregnancy. *Acta Endocrinol*, (1993), 128:339-344.

Chard, T. Fetal and maternal oxytocin in human parturition. *Am J Perinatol*, (1989), 6:145-152.

Chardin, P., Camonis, J.H., Gale, N.W., van Aelst, L., Schlessinger, J., Wigler, M.H., Bar-Sagi, D. Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2. *Science*, (1993), 260:1338-1343.

Chen, R., Lewis, K.A., Perrin, M.H., Vale, W. Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, (1993), 90:8967-8971.

Chibbar, R., Miller, F.D., Mitchell, B.F. Synthesis of oxytocin in amnion, chorion, and decidua may influence the timing of human parturition. *J Clin Invest*, (1993), 91:185-192.

Chidiac, P., Hebert, T.E., Valiquette, M., Dennis, M., Bouvier, M. Inverse agonist activity of beta-adrenergic antagonists. *Mol Pharmacol*, (1994), 45:490-499.

Choi, O.H., Adelstein, R.S., Beaven, M.A. Secretion from rat basophilic RBL-2H3 cells is associated with phosphorylation of myosin light chain kinase as well as phosphorylation by protein kinase C. *J Biol Chem*, (1994), 269:536-541.

Chou, M.M., Hou, W., Johnson, J., Graham, L.K., Lee, M.H., Chen, C.S., Newton, A.C., Schaffhausen, B.S., Toker, A. Regulation of protein kinase C zeta by PI 3-kinase and PDK-1. *Curr Biol*, (1998), 8:1069-1077.

Chrousos, G.P., Calabrese, J.R., Avgerinos, P., Kling, M.A., Rubinow, D., Oldfield, E.H., Schuermeyer, T., Kellner, C.H., Cutler, G.B. Jr., Loriaux, D.L. Corticotropin releasing factor: basic studies and clinical applications. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, (1985), 9:349-359.

Chrousos, G.P. Regulation and dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The corticotropin-releasing hormones perspective. *Endocrinol Metab Clin North Am*, (1992), 21:833-858.

Chun, M., Liyanage, U., Lisanti, M.P., Lodish, H.F. Signal transduction of G protein-coupled receptor in caveolae: colocalization of endothelin and its receptor with caveolin. *Proc Natl Acad Sci USA*, (1994), 91:11728-11732.

Chwalisz, K., Garfield, R.E. Regulation of the uterus and cervix during pregnancy and labor: Role of progesterone and nitric oxide. *Ann N Y Acad Sci*, (1997), 828:238-253.

Chwalisz, K. The use of progesterone antagonists for cervical ripening and as an adjunct to labour and delivery. *Hum Reprod*, (1994), 9(Suppl 1):131-161.

- Cimerikic, B., Zamah, R., Ahmed, M.S.** Identification of L-type calcium channels associated with kappa opioid receptors in human placenta. *J Mol Neurosci*, (1998), 10:261-272.
- Clapham, D.E.** Intracellular calcium. Replenishing the stores. *Nature*, (1995), 375:634-635.
- Clementi, E., Scheer, H., Zacchetti, D., Fasolato, C., Pozzan, T., Meldolesi, J.** Receptor-activated Ca^{2+} influx. Two independently regulated mechanisms of influx stimulation coexist in neurosecretory PC12 cells. *J Biol Chem*, (1992), 267:2164-2172.
- Clifton, V.L., Read, M.A., Leitch, I.M., Boura, A.L.A., Robinson, P.J., Smith, R.** Corticotropin-releasing hormones-induced vasodilatation in the human fetal placental circulation. *J Clin Endocrinol Metab*, (1994), 76:666-669.
- Cobb, H.M., Goldsmith, E.J.** How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem*, (1995), 270: 14843-14846.
- Coleman, D.E., Berghuis, A.M., Lee, E., Linder, M.E., Gilman, A.G., Sprang, S.R.** Structures of active conformation of $\text{G}_{\alpha i1}$ and mechanism of GTP hydrolysis. *Science*, (1994), 265:1405-1412.
- Combettes, L., Cheek, T.R., Taylor, C.W.** Regulation of inositol trisphosphate receptors by luminal Ca^{2+} contributes to quantal Ca^{2+} mobilization. *EMBO J*, (1996), 15:2086-2093.
- Conklin, B.R., Bourne, H.R.** Structural elements of $\text{G}\alpha$ subunits that interact with $\text{G}\beta\gamma$, receptors and effectors. *Cell*, (1993), 73:631-641.

Contractor, S.F., Bank, R.W., Jones, C.J.P., Fox, H. A possible role for placental lysosomes in the formation of villous syncytiotrophoblast. *Cell Tissue Res*, (1977), 178:411-419.

Corr, L.A., Aberdeen, J.A., Milner, P., Lincoln, J., Burnstock, G. Sympathetic and nonsympathetic neuropeptide Y-containing nerves in the rat myocardium and coronary arteries. *Circ Res*, (1990), 66:1602-1609.

Cox, M.E., Parsons, S.J. Roles for protein kinase C and mitogen-activated protein kinase in nicotine-induced secretion from bovine adrenal chromaffin cells. *J Neurochem*, (1997), 69:1119-1130.

Crane, J.T., Riley, L., Rodica, E., Castracane, V.D., Majzoub, J.A. Glucocorticoid regulation of placental corticotropin releasing hormone (CRH) during human pregnancy. *Proc 75th Annu Meeting Endocrine Soc*, (1993), 1282 (résumé)

Creasy, R.K. Preterm birth prevention: where are we? *Am J Obstet Gynecol*, (1993), 168:1223-1230.

Crespo, P., Xu, N., Simonds, W.F., Gutkind, J.S. Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein $\beta\gamma$ subunits. *Nature*, (1994), 369:418-420.

Cribbs, L.L., Lee, J.H., Yang, J., Satin, J., Zhang, Y., Daud, A., Barclay, J., Williamson, M.P., Fox, M., Rees, M., Perez-Reyes, E. Cloning and characterization of $\alpha 1H$ from human heart, a member of the T-type Ca^{2+} channel gene family. *Circ Res*, (1998), 83:103-109.

Cross, J.C. Formation of the placenta and extraembryonic membranes. *Ann NY Acad Sci*, (1998), 857:23-32.

Crowley, W.R., Kalra, S.P. Neuropeptide Y stimulates the release of luteinizing hormone-releasing hormone from medial basal hypothalamus in vitro: modulation by ovarian hormones. *Neuroendocrinology*, (1987), 46:97-103.

Crowley, W.R., Hassid, A., Kalra, S.P. Neuropeptide Y enhances the release of luteinizing hormone (LH) induced by LH-releasing hormone. *Endocrinology*, (1987), 120:941-945.

Crowley, W.R., Shah, G.V., Carroll, B.L., Kennedy, D., Dockter, M.E., Kalra, S.P. Neuropeptide-Y enhances luteinizing hormone (LH)-releasing hormone-induced LH release and elevations in cytosolic Ca²⁺ in rat anterior pituitary cells: evidence for involvement of extracellular Ca²⁺ influx through voltage-sensitive channels. *Endocrinology*. (1990), 127:1487-1494.

Csapo, A.I. The "see-saw" theory of parturition. *Ciba Found Symp*, (1977), 47:159-210.

Cui, Z.J., Hidaka, H., Dannies, P.S. KN-62, a calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor, inhibits high potassium-stimulated prolactin secretion and intracellular calcium increases in anterior pituitary cells. *Biochim Biophys Acta*, (1996), 1310:343-347.

Daaka, Y., Luttrell, L.M., Ahn, S., Della Rocca, G.J., Fergusson, S.S.G., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. Essential role for G protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, (1998), 272:685-688.

Damsky, C.H., Fitzgerald, M.L., Fisher, S.J. Distribution patterns of extracellular matrix components and adhesion receptors are intricately modulated during first trimester cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway, *in vivo*. *J Clin Invest*, (1992) 89:210-222.

Damsky, C.H., Librach, C., Lim, K.H., Fitzgerald, M.L., McMaster, M.T., Janatpour, M., Zhou, Y., Logan, S.K., Fisher, S.J. Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. *Development*, (1994), 120:3657-3666.

Daniels, A.J., Lazarowski, E.R., Matthews, J.E., Lapetina, E.G. Neuropeptide Y mobilizes intracellular Ca^{2+} and increases inositol phosphate production in human erythroleukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun*, (1989), 165:1138-1144.

Daniels, A.J., Matthews, J.E., Viveros, O.H., Lazarowski, E.R. Characterization of the neuropeptide Y-induced intracellular calcium release in human erythroleukemic cells. *Mol Pharmacol*, (1992), 41:767-771.

Daniels, A.J., Viveros, O.H., Matthews, J.E. The role of extracellular calcium in the neuropeptide-Y-induced increase in cytosolic calcium in human erythroleukemic (HEL) cells. *Mol Cell Neurosci*, (1994), 5:466-474.

Daniels, A.J., Matthews, J.E., Slepatis, R.J., Jansen, M., Viveros, O.H., Tadepalli, A., Harrington, W., Heyer, D., Landavazo, A., Leban, J.J., Spaltenstein, A. Novel high-affinity neuropeptide Y receptor antagonists. *Proc Natl Acad Sci USA*, (1995), 92:9067-9071.

Darne, J., McGarrigle, H.H., Lachelin, G.C. Saliva oestriol, oestradiol, oestrone and progesterone levels in pregnancy: spontaneous labour at term is preceded by a rise in the saliva oestriol:progesterone ratio. *Br J Obstet Gynaecol*, (1987), 94:227-235.

Daub, H., Weiss, F.U., Wallasch, C., Ullrich, A. Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature*, (1996), 379:557-560.

De Ikonoff, L.K., Cedard, L. Localization of human chorionic gonadotropic and somatomammotropic hormones by the peroxydase immunoenzymologic method in villi and amniotic epithelium of human placenta (from 6 weeks to term). *Am J Obstet Gynecol*, (1973), 116:1124-1132.

De Léan, A., Stadel, J.M., Lefkowitz, R.J. A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled β -adrenergic receptor. *J Biol Chem*, (1980), 255:7108-7117.

Della Rocca, G.J., van Biesen, T., Daaka, Y., Luttrell, D., Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J. Ras-dependent mitogen-activated protein kinase activation by G protein-coupled receptors. *J Biol Chem*, (1997), 272:19125-19132.

Delouche, B., Pradel, L.A., Henry, J.P. Phosphorylation by protein kinase C of annexin 2 in chromaffin cells stimulated by nicotine. *J Neurochem*, (1997), 68:1720-1727.

Demir, R., Kaufmann, P., Castellucci, M., Erbeni, T., Kotowski, A. Fetal vasculogenesis and angiogenesis in human placental villi. *Acta Anat*, (1989), 136:190-203.

Demir, R., Kosanke, G., Kohlen, G., Kertschanska, S., Kaufmann, P. Classification of human placental stem villi: review of structural and functional aspects. *Microsc Res Tech*, (1997), 38:29-41.

Dempsey, E.W., Zergollern, L. Zonal regions of the placental barrier. *Anat Rec*, (1969), 163:177 (résumé)

- Dennis, E.A., Rhee, S.G., Billah, M.M., Hannun, Y.A.** Role of phospholipases in generating lipid second messengers in signal transduction. *FASEB*, (1991), 5:2068-2077.
- De Waard, M.D., Gurnett, C.A., Campbell, K.P.** Structural and functional diversity of voltage-activated calcium channels. In : Narahashi T. (Eds). *Ion channels*. Plenum Press, New York, 1996
- De Waard, M.D., Liu, H., Walker, D., Scott, V.E.S., Gurnett, C.A., Campbell, K.P.** Direct binding of G-protein $\beta\gamma$ complex to voltage-dependent calcium channels. *Nature*, (1997), 385:446-450.
- Dibbs, K.I., Anteby, E., Mallon, M.A., Sadovsky, Y., Adler, S.** Transcriptional regulation of human placental corticotropin-releasing factor by prostaglandins and estradiol. *Biol Reprod*, (1997), 57:1285-1292.
- Dieterich, S., Herget, T., Link, G., Bottinger, H., Pfizenmaier, K., Johannes, F.J.** In vitro activation and substrates of recombinant, baculovirus expressed human protein kinase C μ . *FEBS Lett*, (1996), 381:183-187.
- Dikic, I., Tokiwa, G., Lev, S., Courtneidge, S.A., Schlessinger, J.** A role for PyK2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature*, (1996), 383: 547-550.
- Divecha, N., Irvine, R.F.** Phospholipid signaling. *Cell*, (1995), 80:269-278.
- Dohlman, H.G., Thorner, J., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J.** Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu Rev Biochem*, (1991), 60:653-988.

Donaldson, C.J., Sutton, S.W., Perrin, M.H., Corrigan, A.Z., Lewis, K.A., Rivier, J.E., Vaughan, J.M., Vale, W. Cloning and characterization of human urocortin. *Endocrinology*, (1996) 137:2167-2170.

Doods, H.N., Wieland, H.A., Engel, W., Eberlein, W., Willin, K.-D., Entzeroth, W., Rudolf, K. BIBP 3226, the first selective neuropeptide Y1 receptor antagonist: a review of its pharmacological properties. *Regul Pept*, (1996), 65:71-77.

Douglas, D.N., Fink, H.S., Ridgway, N.D., Cook, H.W., Byers, D.M. Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate is phosphorylated and translocated by a phorbol ester-insensitive and calcium-independent protein kinase C isoform in C6 glioma cell membranes. *Biochim Biophys Acta*, (1999), 1448:439-449.

Drachenberg, C.B., Papadimitriou, J.C. Endocrine secretory granules and crystals in the syncytiotrophoblast. *J Submicrosc Cytol Pathol*, (1992), 24:123-127.

Dreskin, R.B., Spicer, S.S., Greene, W.B. Ultrastructural localization of chorionic gonadotropin in human term placenta. *J Histochem Cytochem*, (1970), 18:862-874.

Du, P., Salon, J.A., Tamm, J.A., Hou, C., Cui, W., Walker, M.W., Adham, N., Dhanoa, D.S., Islam, I., Vaysse, P.J., Dowling, B., Shifman, Y., Boyle, N., Rueger, H., Schmidlin, T., Yamaguchi, Y., Branchek, T.A., Weinshank, R.L., Gluchowski, C. Modeling the G-protein-coupled neuropeptide Y Y1 receptor agonist and antagonist binding sites. *Protein Eng*, (1997), 10:109-117.

Duc-Goiran, P., Mignot, T.M., Bourgeois, C., Ferre, F. Embryo-maternal interactions at the implantation site: a delicate equilibrium. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, (1999), 83:85-100.

Duello, T.M., Tsai, S.J., Van Ess, P.J. *In situ* demonstration and characterization of pro-gonadotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in first trimester human placentas. *Endocrinology*, (1993), 133:2617-2623.

Dumont, Y., Fournier, A., St-Pierre, S., Schwartz, T.W., Quirion, R. Differential distribution of neuropeptide Y₁ and Y₂ receptors in the rat brain. *Eur J Pharmacol*, (1990), 191:501-503.

Dumont, Y., Fournier, A., St-Pierre, S., Quirion, R. Comparative characterization and autoradiographic distribution of neuropeptide Y receptor subtypes in rat brain. *J Neurosci*, (1993), 13:73-86.

Dumont, Y., Cadieux, A., Pheng, L., Fournier, A., St-Pierre, S., Quirion, R. Polypeptide YY derivatives as selective neuropeptide Y/polypeptide YY Y₁ and Y₂ agonists devoid of affinity for the Y₃ receptor sub-type. *Molec Brain Res*, (1994), 26:320-324.

Dutil, E.M., Toker, A., Newton, A.C. Regulation of conventional protein kinase C isozymes by phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK-1). *Curr Biol*, (1998), 8:1366-1375.

Eason, R.A. CaM kinase II: a protein kinase with extraordinary talents germane to insulin exocytosis. *Diabetes*, (1999), 48:675-684.

Eason, M., Jacinto, M.T., Liggett, S.B. Contribution of ligand structure to activation of α_2 -adrenergic receptor subtype coupling to G_s. *Mol Pharmacol*, (1994), 45:696-702.

- Economides, D., Linton, E., Nicolaidis, K., Rodeck, C.H., Lowry, P.J., Chard, T.** Relationship between maternal and fetal corticotrophin-releasing factor-41 and ACTH levels in human mid-trimester pregnancy. *J Endocrinology*, (1987), 114:497-501.
- Ekblad, E., Håkanson, R., Sundler, F.** VIP and PHI coexist with NPY-like peptide in intramural neurons of the small intestine. *Regul Pept*, (1984), 10:47-55.
- Ekman, R., Wahlestedt, C., Böttcher, G., Sundler, F., Håkanson, R., Panula, P.** Peptide YY-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat. *Regul Pept*, (1986), 16:157-168.
- El Mabrouk, M., Simoneau, L., Bouvier, C., Lafond, J.** Asymmetrical distribution of G proteins in syncytiotrophoblastic brush-border and basal-plasma membranes of human term placenta. *Placenta*, (1996), 17:471-477.
- Emanuel, R.L., Girard, D.M., Thull, D.L., Majzoub, J.A.** Second messengers involved in the regulation of corticotropin-releasing hormone mRNA and peptide in cultured rat fetal hypothalamic primary cultures. *Endocrinology*, (1990), 126:3016-3021.
- Entenmann, A.H., Seeger, H., Voelter, W., Lippert, T.H.** Relaxin deficiency in the placenta as possible cause of cervical dystocia. A case report. *Clin Exp Obstet Gynecol*, (1988), 15:13-17.
- Erdbrugger, W., Vischer, P., Bauch, H.J., Michel, M.C.** Norepinephrine and neuropeptide Y increase intracellular Ca^{2+} in cultured porcine aortic smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol*, (1993), 22:97-102.
- Eriksson, H., Berglund, M.M., Holmberg, S.K., Kahl, U., Gehlert, D.R., Larhammar, D.** The cloned guinea pig pancreatic polypeptide receptor Y4 resembles more the human Y4 than does the rat Y4. *Regul Pept*, (1998), 75-76:29-37.

- Eva, C., Keinänen, K., Monyer, H., Seeburg, P., Sprengel, R.** Molecular cloning of a novel G protein-coupled receptor that may belong to the neuropeptide receptor family. *FEBS Lett*, (1990), 271:80-84.
- Eva, C., Oberto, A., Sprengel, R., Genazzani, E.** The murine NPY-1 receptor gene. Structure and delineation of tissue-specific expression. *FEBS Lett*, (1992), 314:285-288.
- Evain-Brion, D.** Maternal endocrine adaptations to placental hormones in humans. *Acta Paediatr Suppl*, (1999), 428:12-16.
- Ewald, D.A., Sternweis, P.C., Miller, R.J.** Guanine nucleotide-binding protein G α -induced coupling of neuropeptide Y receptors to Ca²⁺ channels in sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, (1988), 85: 3633-3637.
- Exton, J.H.** Phospholipase D. *Biochim Biophys Acta*, (1998), 105-115.
- Facchinetti, F., Garuti, G.C., Petraglia, F., Mercantini, F., Genazzani, A.R.** Changes in β -endorphin in fetal membranes and placenta in normal and pathological pregnancies. *Acta Obstet Scand*, (1990), 69:603-607.
- Fallgren, B., Edvinsson, L., Ekblad, E., Ekman, R.** Involvement of perivascular neuropeptide Y nerve fibres in uterine arterial vasoconstriction in conjunction with pregnancy. *Regul Pept*, (1989), 24:119-130.
- Fang, J., Furesz, T.C., Lurent, R.S., Smith, C.H., Fant, M.E.** Spatial polarization of insulin-like growth factor receptors on the human syncytiotrophoblast. *Pediatr Res*, (1997), 41:258-265.

- Feletou, M., Rodriguez, M., Beauverger, P., Germain, M., Imbert, J., Dromaint, S., Macia, C., Bourrienne, A., Henlin, J.M., Nicolas, J.P., Boutin, J.A., Galizzi, J.P., Fauchere, J.L., Canet, E., Duhault, J.** NPY receptor subtypes involved in the contraction of the proximal colon of the rat. *Regul Pept*, (1998), 75-76:221-229.
- Fencl, M.D., Stillman, R.J., Cohen, J., Tulchinsky, D.** Direct evidence of sudden rise in fetal corticoids late in human gestation. *Nature*, (1980), 287:225-226.
- Ferrari, A., Petraglia, F., Gurbide, E.** Corticotropin-releasing factor decidualize human endometrial stromal cells *in vitro*. Interaction with progestin. *J Steroid Biochem Mol Biol*, (1995), 54:251-255.
- Ferri, G.L., Adrian, T.E., Allen, J.M., Soimero, L., Cancellieri, A., Yeats, J., Blank, M., Polak, J.M., Bloom, S.R.** Intramural distribution of regulatory peptides in the sigmoid-rectoanal region of the human gut. *Gut*, (1988), 29:762-768.
- Fields, P.A., Larkin, L.H.** Purification, immunohistochemical localization of relaxin in the human term placenta. *J Clin Endocrinol Metab*, (1981), 52:772-778.
- Figuroa, J.P., Honnebier, M.B., Binienda, Z., Wimsatt, J., Nathanielsz, P.W.** Effect of a 48-hour intravenous delta 4-androstenedione infusion on the pregnant rhesus monkey in the last third of gestation: changes in maternal plasma estradiol concentrations and myometrial contractility. *Am J Obstet Gynecol*, (1989), 161:481-486.
- Fisher, G.J., Kelley, L.K., Smith, C.H.,** ATP-dependent calcium transport across basal plasma membranes of human placental trophoblast. *Am J Physiol*, (1987), 252:C38-C46.
- Flamigni, C., Bulletti, C., Polli, V., Ciotti, P.M., Prefetto, R.A., Galassi, A., Di Cosmo, E.** Factors regulating interaction between trophoblast and human endometrium. *Ann NY Acad Sci*, (1991), 622:176-190.

- Fleming, I.N., Elliot, C.M., Exton, J.H.** Differential translocation of Rho family GTPases by lysophosphatidic acid, Endothelin-1, and platelet-derived growth factor. *J Biol Chem*, (1996), 271:33067-33073.
- Flood, J.F., Hernandez, E.N., Morley, J.E.** Modulation of memory processing by neuropeptide. *Brain Res*, (1987), 421:280-290.
- Florio, P., Lombardo, M., Gallo, R., Di Carlo, C., Sutton, S., Genazzani, A.R., Petraglia, F.** Activin A, corticotropin-releasing factor and prostaglandin F2 alpha increase immunoreactive oxytocin release from cultured human placental cells. *Placenta*, (1996), 17:307-311.
- Foucart, S., Majewski, H.** Inhibition of noradrenaline release by neuropeptide Y in mouse atria does not involve inhibition of adenylate cyclase or a pertussis toxin-susceptible G protein. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, (1989), 340:658-665.
- Fox, H., Blanco, A.** Scanning electron microscopy of the human placenta in normal and abnormal pregnancies. *Eur J Obstet Gynecol*, (1974), 4:45-50.
- Fournet-Dulguerov, N., MacLusky, N.J., Leranth, C.Z., Todd, R., Mendelson, C.R., Simpson, E.R., Naftolin, F.** Immunohistochemical localization of aromatase cytochrome P-450 and estradiol dehydrogenase in the syncytiotrophoblast of the human placenta. *J Clin Endocrinol Metab*, (1987), 65:757-764.
- Freedman, N.J., Lefkowitz, R.J.** Desensitization of G protein-coupled receptors. *Recent Prog Horm Res*, (1996), 51:319-351.
- Freitag, C., Svendsen, A.B., Feldthus, N., Lössl, K., Sheikh, S.P.** Coupling of the human Y2 receptor for neuropeptide Y and peptide YY to guanine nucleotide inhibitory proteins in permeabilized SMS-KAN cells. *J Neurochem*, (1995), 64:643-650.

- Fried, G., Hokfelt, T., Lundberg, J.M., Terenius, L., Hamberger, L.** Neuropeptide Y and noradrenaline in human uterus and myometrium during normal and pre-eclamptic pregnancy. *Hum Reprod*, (1986), 1:359-364.
- Fried, G., Samuelson, U.** Endothelin and neuropeptide Y are vasoconstrictors in human uterine blood vessels. *Am J Obstet Gynecol*, (1991), 164:1330-1336.
- Frim, D.M., Emanuel, R.L., Robinson, B.G., Smas, C.M., Adler, G.K., Majzoud, J.A.** Characterization of gestational regulation of corticotropin-releasing hormone messenger RNA in human placenta. *J Clin Invest*, (1988), 82:287-291.
- Fuchs, A.R., Husslein, P., Fuchs, F.** Oxytocin and the initiation of human parturition. II. Stimulation of prostaglandin production in human decidua by oxytocin. *Am J Obstet Gynecol*, (1981), 141:694-697.
- Fuchs, A.R., Fuchs, F., Husslein, P., Soloff, M.S., Fernstrom, M.J.** Oxytocin, receptors and human parturition: a dual role for oxytocin in the initiation of labor. *Science*, (1982), 215:1396-1398.
- Fuchs, A.R., pariyasamy, S., Alexandrova, M., Soloff, M.S.** Correlation between oxytocin receptor concentration and responsiveness to oxytocin in pregnant rat myometrium: Effects of ovarian steroids. *Endocrinology*, (1983), 113:742-749.
- Fuchs, A.R., Romero, R., Keefe, D., Oyarzun, E., Behnke, E.** Oxytocin secretion and human parturition: pulse frequency and duration increase during spontaneous labour in women. *Am J Obstet Gynecol*, (1991), 165:1515-1523.
- Fuhlendorff, J., Gether, U., Aakerlund, L., Langeland-Johansen, N., Thøgersen, H., Melberg, S.G., Olsen, U.B., Thastrup, O., Schwartz, T.W.** [Leu³¹, Pro³⁴] neuropeptide Y: a specific Y₁ receptor agonist. *Proc Natl Acad Sci USA*, (1990), 87:182-186.

- Fujimoto, S., Hamasaki, K., Ueda, H., Kagawa, H.** Immunoelectron microscope observations on secretion of human placental lactogen (hPL) in the human chorionic villi. *Anat Rec*, (1986), 216:68-72.
- Fujise, A., Mizuno, K., Ueda, Y., Osada, S., Hirai, S., Takayanagi, A., Shimizu, N., Owada, M.K., Nakajima, H., Ohno, S.** Specificity of the high affinity interaction of protein kinase C with a physiological substrate, myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate. *J Biol Chem*, (1994), 269:31642-31648.
- Furukawa, T., Nukada, T., Mori, Y., Wakamori, M., Fujita, Y., Ishida, H., Kazuhiko, F., Kato, S., Yoshii, M.** Differential interaction of the C-terminus and cytoplasmic I-II loop of neuronal Ca^{2+} channels with G-protein \forall and \exists (subunits: I. molecular determination. *J Biol Chem*, (1998), 273:17585-17594.
- Furutani, Y., Morimoto, Y., Shibahara, S., Noda, M., Takahashi, H., Hirose, T., Asai, M., Inayama, S., Hayashida, H., Miyata, T., Numa, S.** Cloning and sequence analysis of cDNA for ovine corticotropin-releasing factor precursor. *Nature*, (1983), 301:537-540.
- Gabr, R.W., Gladfelter, W.E., Birkle, D.L., Azzaro, A.J.** *In vivo* microdialysis of corticotropin-releasing factor (CRF): calcium dependence of depolarization-induced neurosecretion of CRF. *Neurosci Lett*, (1994), 169:63-67.
- Garcia-Paramio, P., Cabrerizo, Y., Bornancin, F., Parker, P.J.** The broad specificity of dominant inhibitory protein kinase C mutants infers a common step in phosphorylation. *Biochem J*, (1998), 333:631-636.
- Garfield, R.E., Kannan, M.S., Daniels, E.E.** Gap junction formation in myometrium: control by estrogen, progesterone and prostaglandins. *Am J Physiol*, (1980), 238: C81-C89.

Garfield, R.E., Ali, M., Yallampalli, C., Izumi, H. Role of gap junctions and nitric oxide in control of myometrial contractility. *Semin Perinatol*, (1995), 19:41-51.

Garnica, A.D., Chan, W.Y. The role of the placenta in fetal nutrition and growth. *J Am Coll Nutr*, (1996), 15:206-222.

Gaussrau, R., Graf, R., Ruhnke, M., Hanski, C. Proteases in the human full-term placenta. *Histochemistry*, (1987), 86:405-413.

Gehlert, D.R., Schober, D.A., Beavers, L., Gadski, R., Hoffman, J.A., Smiley, D.L., Chance, R.E., Lundell, I., Larhammar, D. Characterization of the peptide binding requirements for the cloned human pancreatic polypeptide-preferring receptor. *Mol Pharmacol*, (1996a), 50:112-118.

Gehlert, D.R., Beavers, L., Johnson, D., Gackenheimer, S.L., Schober, D.A., Gadski, R. Expression cloning of a human brain neuropeptide Y Y2 receptor. *Mol Pharmacol*, (1996b), 49:224-228.

Gehlert, D.R. Multiple receptors for the pancreatic polypeptide (PP-fold) family: physiological implication. *Proc Soc Exp Biol Med*, (1998), 218:7-22.

Geimonen, E., Boylston, E., Royek, A., Andersen, J. Elevated connexin-43 expression in term human myometrium correlates with elevated c-Jun expression and is independent of myometrial estrogen receptors. *J Clin Endocrinol Metab*, (1998), 83:1177-1185.

Genbacev, O., Robyn, C., Pantic, V. Localization of chorionic gonadotropin in human term placenta on ultrathin sections with peroxidase-labeled antibody. *J Microsc*, (1972), 15:399-402.

- Genoud, S., Pralong, W., Riederer, B.M., Eder, L., Catsicas, S., Muller, D.** Activity-dependent phosphorylation of SNAP-25 in hippocampal organotypic cultures. *J Neurochem*, (1999), 72:1699-1706.
- Gerald, C., Walker, M.W., Vaysse, P.J-J., He, C., Branchek, T.A., Weinshank, R.L.** Expression, cloning and pharmacological characterization of a human hippocampal neuropeptide Y/peptide YY Y2 receptor subtype. *J Biol Chem*, (1995), 270:26758-26761.
- Gerald, C., Walker, M.W., Criscone, L., Gustafson, E.L., Batzl-Hartmann, C., Smith, K., Vaysse, P.J-J., Durkin, M.M., Laz, T.M., Linemeyer, D.L., Schaffhauser, A.Q., Whitebread, S., Hofbauer, K.G., Table, I., Branchek, T.A., Weinshank, R.L.** A receptor subtype involved in neuropeptide Y induced food intake. *Nature*, (1996), 382:168-171.
- Gether, U., Kobilka, B.** G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J Biol Chem*, (1998), 17979-17982.
- Gill, P.S., Regmi, A., Porter-Gill, P.A., Kasckow, J.W.** Interleukin-1 regulation of corticotropin-releasing factor (CRF), glucocorticoid receptor, c-fos, c-jun messenger RNA in the NPLC-KC cell line. *Mol Cell Endocrinol*, (1998), 137:31-39.
- Gilman, A.G.** G protein: transducers of receptor-generated signal. *Annu Rev Biochem*, (1987), 56:615-649.
- Girard, S., Clapham, D.** Acceleration of intracellular calcium waves in *Xenopus* oocytes by calcium influx. *Sciences*, (1993), 260:229-232.

- Glover, D.D., Barlow, D.J., Pitts, J.E., Woods, S.P., Tickle, I.J., Blundell, T.L., Tatemoto, K., Kimmel, J.R., Wollmer, A., Strassburger, W., Zhang, Y.S.** Conformational studies on the pancreatic polypeptide hormone family. *Eur J Biochem*, (1985), 142:379-385.
- Gluckman, P.D., Sizonenko, S.V., Bassett, N.S.** The transition from fetus to neonate – an endocrine perspective. *Acta Paediatr*, (1999), 428(Suppl):7-11.
- Goland, R.S., Wardlaw, S.L., Stark, R.I., Brown, L.S., Frantz, A.G.** High levels of corticotropin-releasing hormone immunoreactivity in maternal and fetal plasma during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*, (1986), 63:1199-1204.
- Goland, R.S., Wardlaw, S.L., Blum, M., Tropper, P.J., Stark, R.I.** Biologically active corticotropin-releasing hormone immunoreactivity in maternal and fetal plasma during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, (1988), 159:884-890.
- Goland, R.S., Wardlaw, S.L., MacCarter, G., Warren, W.B., Stark, R.I.** Adrenocorticotropin and cortisol responses to vasopressin during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*, (1991), 73: 257-261.
- Goland, R.S., Conwell, I.M., Warren, W.B., Wardlaw, S.L.** Placental corticotropin-releasing hormone and pituitary-adrenal function during pregnancy. *Neuroendocrinol*, (1992), 56:742-749.
- Goland, R.S., Jozak, S.M., Conwell, I.M.** Placental corticotropin-releasing hormones and the hypercortisolism of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, (1994), 171:1287-1291.
- Goland, R.S., Tropper, P.J., Warren, W.B., Stark, R.I., Jozak, S.M., Conwell, I.M.** Concentrations of corticotrophin-releasing hormone in the umbilical-cord blood of pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Reprod Fertil Dev*, (1995), 7:1227-1230.

- Goodwin, T.M.** A role for estriol in human labor, term and preterm. *Am J Obstet Gynecol*, (1999), 180:S208-S213.
- Graham, C.H., Lala, P.K.** Mechanisms of placental invasion of the uterus and their control. *Biochem Cell Biol*, (1992), 70:867-874.
- Graham, C.H., Lysiak, J.J., McCrea, K.R., Lala, P.K.** Localization of transforming growth factor-beta at the human fetal-maternal interface : role in trophoblast growth and differentiation. *Biol Reprod*, (1992), 46 :561-572.
- Grandt, D., Schimickzek, M., Feth F., Ahrens, O., Rascher, W., Singer, M.P., Goebell, H., Reeve, J.R.jr., Esselein, V.E.** Discovery of a new molecular form of neuropeptide Y from porcine brain, NPY 3-36, which selectively binds to Y2 receptors. *Regul Pept*, (1992), 40:161(résumé).
- Goumain, M., Voisin, T., Lorinet, A.M., Laburthe, M.** Identification and distribution of mRNA encoding the Y₁, Y₂, Y₄, and Y₅ receptors for peptides of the PP-fold family in the rat intestine and colon. *Biochem Biophys Res Comm*, (1998), 247:52-56.
- Graff, J.M., Rajan, R.R., Randall, R.R., Nairn, A.C., Blackshear, P.J.** Protein kinase C substrate and inhibitor characteristics of peptides derived from the myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) protein phosphorylation site domain. *J Biol Chem*, (1991), 266:14390-14398.
- Grandt, D., Schimickzek, Rascher, W., M., Feth F., Shively, J., Lee, T.D., Davis, M.T., Reeve, J.R.jr., Michel, M.C.** Neuropeptide Y 3-36 is an endogenous ligand selective for Y2 receptors. *Regul Pept*, (1996), 67:33-37.
- Gregor, P., Millham, M.L., Feng, Y., DeCarr, L.B., McCaleb, M.L., Cornfield, L.J.** Cloning and characterization of a novel receptor to pancreatic polypeptide, a member of the neuropeptide Y receptor family. *FEBS Lett*, (1996a), 58-62.

- Gregor, P., Feng, Y., DeCarr, L.B., Cornfield, L.J., McCaleb, M.L.** Molecular characterization of a second mouse pancreatic polypeptide receptor and its inactivated human homologue. *J Biol Chem*, (1996b), 271:27776-27781.
- Green, T., Ford, H.C.** Human placental microvilli contain high-affinity binding sites for folate. *Biochem J*, (1984), 75-80.
- Greenberg, D.A.** Calcium channels in neurobiological disease. *Ann Neurol*, (1997), 42:275-282.
- Grino, M., Chrousos, G.P., Margioris, A.N.** The corticotropin releasing hormone gene is expressed in human placenta. *Biochem Biophys Res Commun*, (1987), 148:1208-1214.
- Gromada, J., Hoy, M., Renstrom, E., Bokvist, K., Eliasson, L., Gopel, S., Rorsman, P.** CaM kinase II-dependent mobilization of secretory granules underlies acetylcholine-induced stimulation of exocytosis in mouse pancreatic B-cells. *J Physiol*, (1999), 518:745-759.
- Grullon, K., Jacobs, M.M., Li, S.X., Illsley, N.P.** Beta-adrenergic regulation of cyclic AMP synthesis in cultured human syncytiotrophoblast. *Placenta*, (1995), 16:589-597.
- Grundemar, L., Wahlestedt, C., Reis, D.J.** Neuropeptide Y acts at an atypical receptor to evoke cardiovascular depression and to inhibit glutamate responsiveness in brainstem. *J Pharmacol Exp Ther*, (1991), 258:633-638.
- Guan, X.-M., Amend, A., Strader, C.D.** Determination of structural domains for G protein coupling and ligand binding in β_3 -adrenergic receptor. *Mol Pharmacol*, (1995), 48:492-498.

- Gundermann, T., Schöneberg, T., Schultz, G.** Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors. *Annu Rev Neurosci*, (1997), 20:399-427.
- Gutkind, J.S.** The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem*, (1998), 273:1839-1842.
- Haas, D.A., George, S.R.** Neuropeptide Y administration acutely increase hypothalamic corticotropin-releasing factor immunoreactivity: lack of effect in other rat brain regions. *Life Sci*, (1987), 41:2725-2731.
- Haas, T.A., Plow, E.F.** Integrin-ligand interactions: a year in review. *Curr Opin Cell Biol*, (1994), 6:656-662.
- Hahnocky, G., Thomas, A.P.** The inositol triphosphate calcium channel is inactivated by inositol triphosphate. *Nature*, (1994), 370:474-477.
- Hamanaka, N., Tanizawa, O., Hashimoto, T., Yoshinari, S., Okudaira, Y.** Electron microscopic study on the localization of human chorionic gonadotropin (hCG) in the chorionic tissue by enzyme labeled antibody technique. *J Electron Microsc*, (1971), 20:46-48.
- Hamid, J., Nelson, D., Spaetgens, R., Dubel, S.J., Snutch, T.P., Zamponi, G.W.** Identification of an integration center for cross-talk between protein kinase C and G protein modulation of N-type calcium channels. *J Biol Chem*, (1999), 274:6195-6202.

- Hammond, S.M., Jenco, J.M., Nakashima, S., Cadwallader, K., Gu, Q., Cook, S., Nozawa, Y., Prestwich, G.D., Frohman, M.A., Morris, A.J.** Characterization of two alternately spliced forms of phospholipase D1. Activation of the purified enzymes by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, ADP-ribosylation factor, and Rho family monomeric GTP-binding proteins and protein kinase C- β . *J Biol Chem*, (1997), 272:3860-3868.
- Han, S.W., Lei, Z.M., Rao, C.V.** Treatment of human endometrial stromal cells with chorionic gonadotropin promotes their morphological and functional differentiation into decidua. *Mol Cell Endocrinol*, (1999), 147:7-16.
- Hanson, P.I., Schulman, H.** Neuronal Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinases. *Annu Rev Biochem*, (1992), 61 :559-601.
- Harrison, S.C.** Peptide-surface association : the case of PDZ and PTB domains. *Cell*, (1996), 86 :341-343.
- Hawes, B.E., Luttrell, L.M., van Biesen, T., Lefkowitz, R.J.** Phosphatidylinositol 3-kinase is an early intermediate in the $G\beta\gamma$ -mediated mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J Biol Chem*, (1997), 271 :12133-12136.-
- Hay, D.L., Lopata, A.** Chorionic gonadotropin secretion by human embryos in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*, (1988) 67:1322-1324
- Hay, W.W. Jr.** Placental transport of nutrients to the fetus. *Horm Res*, (1994), 42:215-222.
- Hébert, T.E., Bouvier, M.** Structural and functional aspects of G protein-coupled receptor oligomérisation. *Biochem Cell Biol*, (1998), 76:1-11.

- Hedge, S.S., Bonhaus, D.W., Stanley, W., Eglen, R.M., Moy, T.M., Loeb, M., Shetty, S.G., Desouza, A., Krstenansky, J.** Pharmacological evaluation of 1299U91, a novel high-affinity and selective neuropeptide Y-Y₁ receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*, (1995), 275:1261-1266.
- Hedin, K.E., Bell, M.P., Huntoon, C.J., Karnitz, L.M., McKean, D.J.** Gi proteins use a novel beta gamma- and Ras-independent pathway to activate extracellular signal-regulated kinase and mobilize AP-1 transcription factors in Jurkat T lymphocytes. *J Biol Chem*, (1999), 274:19992-20001.
- Heemskerk, F.M., Chen, H.C., Huang, F.L.** Protein kinase C phosphorylates Ser152, Ser156 and Ser163 but not Ser160 of MARCKS in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun*, (1993), 190:236-241.
- Heinrich, D., Metz, J., Raviola, E., Forssmann, W.G.** Ultrastructure of perfusion fixed fetal capillaries in the human placenta. *Cell Tissue Res*, (1976), 172:157-169.
- Herget, T., Oehrlein, S.A., Pappin, D.J., Rozengurt, E., Parker, P.J.** The myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS) is sequentially phosphorylated by conventional, novel and atypical isoforms of protein kinase C. *Eur J Biochem*, (1995), 233:448-457.
- Hertig, A.T., Rock, J., Adams, E.C.** A description of 34 ova within the first 17 days of development. *Am J Anat*, (1956), 98:435-494.
- Herzog, H., Hort, Y.J., Ball, H.J., Hayes, G., Shine, J., Selbie, L.A.** Cloned human neuropeptide Y receptor couples to two different second messenger systems. *Proc Natl Acad Sci USA*, (1992), 89:5794-5798.

- Hexum, T.D., Zheng, J., Zhu, J.** Neuropeptide Y inhibition of nicotinic receptor-mediated chromaffin cell secretion. *J Pharmacol Exp Ther*, (1994), 271:61-66.
- Hildebrandt, J.D.** Role of subunit diversity in signaling by heterotrimeric G protein. *Biochem Pharmacol*, (1997), 54:325-339.
- Hilfiker, S., Pieribone, V.A., Nordstedt, C., Greengard, P., Czernik, A.J.** Regulation of synaptotagmin I phosphorylation by multiple protein kinases. *J Neurochem*, (1999), 73:921-932.
- Hillhouse, E.M., Gramatopoulos, D., Milton, N.G.N., Quartero, H.W.P.** The identification of a human myometrial corticotropin-releasing hormone receptor that increases in affinity during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*, (1993), 76:736-741.
- Hirsh, J.H., Chibbar, R., Mitchell, B.F.** Role of oxytocin in the regulation of uterine activity during pregnancy and the initiation of labor. *Semin Reprod Endocrinol*, (1993), 11:219-242.
- Hofmann, T., Obukhov, A.G., Schaefer, M., Harteneck, C., Gudermann, T., Schultz, G.** Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature*, (1999), 397:259-263.
- Hordijk, P.L., Verlaan, I., van Corven, E.J., Moolenaar, W.H.** Protein tyrosine phosphorylation induced by lysophosphatidic acid in Rat-1 fibroblasts. Evidence that phosphorylation of map kinase is mediated by Gi- p21ras pathway. *J Biol Chem*, (1994), 269:645-651.
- Hoshina, M., Boothby, M., Hussa, R.O., Patillo, R., Camel, H.M., Boime, I.** Linkage of human chorionic gonadotropin and placental lactogen to trophoblast differentiation and tumorigenesis. *Placenta*, (1985), 6:163-172.

- Hoth, M., Penner, R.** Depletion of intracellular stores activates a calcium current in mast cells. *Nature*, (1990), 355:353-356.
- House, C., Kemp, B.E.** Protein kinase contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain. *Science*, (1987), 238:1726-1728.
- Hu, S-B., Tannahill, A., Biswas, S., Lightman, S.L.** Release of corticotropin-releasing factor-41, arginine vasopressin and oxytocin from rat fetal hypothalamic cells in culture: response to activation of intracellular second messengers and to corticosteroids. *J Endocrinol*, (1992a), 132:57-65.
- Hu, S-B., Tannahill, A., Lightman, S.L.** Mechanism of norepinephrine mediated corticotropin-releasing factor-41 release from cultured fetal hypothalamic cells. *Neuroendocrinology*, (1992b), 56:712-718.
- Hu, S-B., Tannahill, A., Lightman, S.L.** Interleukin-1 β induces corticotropin-releasing factor-41 release from cultured hypothalamic cells through protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase pathways. *J Neuroimmunol*, (1992c), 40:49-56.
- Hu, Y., Bloomquist, B.T., Cornfield, L.J., DeCarr, L.B., Flores-Riveros, J.R., Friedman, L., Jiang, P., Lewis-Higgins, L., Sadlowski, Y., Schaefer, J., Valasquez, N., McCaleb, M.L.** Identification of a novel hypothalamic neuropeptide Y receptor associated with feeding behavior. *J Biol Chem*, (1996), 271:26315-26319.
- Hu, X.Q., Singh, N., Mukhopadhyay, D., Akbarali, H.I.** Modulation of voltage-dependent Ca²⁺ channels in rabbit colonic smooth muscle cells by c-Src and focal adhesion kinase. *J Biol Chem*, (1998), 273:5337-5342.

Huhtaniemi, I.T., Korenbrot, C.C., Jaffe, R.B. HCG binding and stimulation of testosterone biosynthesis in the human fetal testis. *J Clin Endocrinol Metab*, (1977), 61:234-238.

Hulstaert, C.E., Torringa, J.L., Koudstaal, J., Hardonk, M.J., Molenaar, I. The characteristic distribution of alkaline phosphatase in the full-term human placenta. *Gynecol Invest*, (1973), 4 :24-30.

Iino, M., Endo, M. Calcium-dependent immediate feedback control of inositol 1,4,5-triphosphate-induced Ca^{2+} release. *Nature*, (1992), 360:76-78.

Imai, K., Kanzaki, H., Fujiwara, H., Maeda, M., Ueda, M., Suginami, H., Mori, T. Expression and localization of aminopeptidase N, neutral endopeptidase, and dipeptidyl peptidase IV in the human placenta and fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol*, (1994), 170:1163-1168.

Inoue, T., Inui, A., Okita, M., Sakatani, N., Oya, M., Morioka, H., Mizuno, N., Oimomi, M., Baba, S. Effect of neuropeptide Y on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the dog. *Life Sci*, (1989), 44:1043-1051.

Itoi, K., Horiba, N., Tozawa, F., Sakai, Y., Sakai, K., Abe, K., Demura, H., Suda, T. Major role of 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase pathway in corticotropin-releasing factor gene expression in the rat hypothalamus in vivo. *Endocrinology*, (1996), 137:2389-2396.

Iwashita, M., Watanabe, M., Adachi, T., Ohira, A., Shinozaki, Y., Takeda, Y., Sakamoto, S. Effect of gonadal steroids on gonadotropin-releasing hormones stimulated human chorionic gonadotropin release by trophoblast cells. *Placenta*, (1989), 10:103-112.

- Jacques, D., Cadieux, A., Dumont, Y., Quirion, R.** Apparent affinity and potency of BIBP3226, a non-peptide neuropeptide Y receptor antagonist, on the purported neuropeptide Y Y₁, Y₂ and Y₃ receptors. *Eur J Pharmacol*, (1995), 278:R3-R5.
- Jaffe, R.B., Mesiano, S., Smith, R., Coulter, C.L., Spencer, S.J., Chakravorty, A.** The regulation and role of fetal adrenal development in human pregnancy. *Endocr Res*, (1998), 24:919-926.
- Jenkin, G., McFarlane, J.R., de Kretser, D.M.** Implication of inhibin and related proteins in fetal development. *Reprod Fertil Dev*, (1995), 7:323-331.
- Jeske, W., Soszynski, P., Rogozinski, W., Lukaszewicz, E., Latoszevska, W., Snochowska, H.** Plasma GHRH, CRH, ACTH, beta-endorphin, human placental lactogen, GH and cortisol concentrations at the third trimester of pregnancy. *Acta Endocrinol*, (1989) 120:785-789.
- Jeske, W., Soszynski, P., Lukaszewicz, E., Debski, R., Latoszevska, W., Rogozinski, W., Snochowska, H., Zgliczynski, S.** Enhancement of plasma corticotropin-releasing hormone in pregnancy-induced hypertension. *Acta Endocrinol*, (1990), 1242:711-714.
- Johannes, F.-J., Prestle, J., Eis, S., Oberhagemann, P., Pfizenmair, K.** PKC μ is a novel, atypical member of the protein kinase C family. *J Biol Chem*, (1994), 269:6140-6148.
- Johnson, J.E., Edwards, A.S., Newton, A.C.** A putative phosphatidylserine binding motif is not involved in the lipid regulation of protein kinase C. *J Biol Chem*, (1997), 30787-30792.
- Jones, S.A., Challis, J.R.G.** Local stimulation of prostaglandin production by corticotropin-releasing hormone in human fetal membranes and placenta. *Biochem Biophys Res Commun*, (1989), 159:186-192.

Jones, S.A., Brooks, A.N., Challis, J.R.G. Steroids modulate corticotropin-releasing factor production in human fetal membranes and placenta. *J Clin Endocrinol Metab*, (1989), 68:825-830.

Jones, S.A., Challis, J.R.G. Effects of corticotropin-releasing hormone and adrenocorticotrophin on prostaglandin out-put by human placental and fetal membranes. *Gynecol Obstet Invest*, (1991), 42: 137-150.

Jones, P.M., Persaud, S.J. Ca²⁺-induced loss of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II activity in pancreatic beta-cells. *Am J Physiol*, (1998), 274:E708-E715.

Jorgensen, J.C., Sheikh, S.P., Forman, A., Norgard, M., Schwartz, T.W., Ottesen, B. Neuropeptide Y in human female genital tract: localization and biological action. *Am J Physiol*, (1989), 257:E220-E227.

Kalra, S.P., Crowley, W.R. Norepinephrine-like effects of neuropeptide Y on LH release in the rat. *Life Sci*, (1984), 35:1173-1176.

Kamath, S.G., Smith, C.H. Na⁺/Ca²⁺ exchange, Ca²⁺ binding, and electrogenic Ca²⁺ transport in plasma membranes of human placental syncytiotrophoblast. *Pediatr Res*, (1994), 36:461-467.

Kameshita, I., Ishida, A., Fujisawa, H. Phosphorylation and activation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase phosphatase by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *FEBS Lett*, (1999), 456:249-252.

Kameya, T., Watanabe, K., Kobayashi, T., Mukojima, T. Enzyme- and immunohistochemical localization of human alkaline phosphatase. *Acta Histochem Cytochem*, (1973), 6:124-136.

- Kanasaki, H., Fukunaga, K., Takahashi, K., Miyazaki, K., Miyamoto, E.** Mitogen-activated protein kinase activation by stimulation with thyrotropin-releasing hormone in rat pituitary GH3 cells. *Biol Reprod*, (1999), 61:319-325.
- Kanda, Y., Richards, R.G., Handwerger, S.** Apolipoprotein A-I stimulates human placental lactogen release by activation of MAP kinase. *Mol Cell Endocrinol*, (1998), 143:125-131.
- Karalis, K., Goodwin, G., Majzoub, J.A.** Cortisol blockade of progesterone: a possible molecular mechanism involved in the initiation of human labor. *Nat Med*, (1996), 2:556-560.
- Kasckow, J.W., Regmi, A., Gill, P.S., Parkes, D.G., Geraciotti, T.D.** Regulation of corticotropin-releasing factor (CRF) messenger ribonucleic acid and CRF peptide in the amygdala: studies in primary amygdalar culture. *Endocrinology*, (1997), 138:4774-4782.
- Kassis, S., Olasmaa, M., Terenius, L., Fishman, P.H.** Neuropeptide Y inhibits cardiac adenylate cyclase through a pertussis toxin-sensitive G protein. *J Biol Chem*, (1987), 262:3429-3431.
- Katada, T., Kurosu, H., Okada, T., Suzuki, T., Tsujimoto, N., Takasuga, S., Kontani, K., Hazeki, O., Ui, M.** Synergistic activation of a family of phosphoinositide 3-kinase via G-protein coupled and tyrosine kinase-related receptors. *Chem Phys Lipids*, (1999), 98:79-86.
- Katan, M.** Families of phosphoinositide-specific phospholipase C: structure and function. *Biochim Biophys Acta*, (1998), 1436: 5-17.
- Katayama, K., Kodaki, T., Nagamachi, Y., Yamashita, S.** Cloning, differential regulation and tissue distribution of alternatively spliced isoforms of ADP-ribosylation-factor-dependent phospholipase D from rat liver. *Biochem J*, (1998), 329:647-652.

- Katz, A., Wu, D., Simon, M.I.** Subunits $\beta\gamma$ of heterotrimeric G protein activate $\beta 2$ isoform of phospholipase C. *Science*, (1992), 360:686-689.
- Kaufmann, P., Sen, D.K., Schweikhart, G.** Classification of human placental villi. *Cell Tiss Res*, (1979), 200:409-423.
- Kawahito, Y., Sano, H., Kawata, M., Yuri, K., Mukai, S., Yamamura, Y., Kato, H., Chrousos, G.P., Wilder, R.L., Kondo, M.** Local secretion of corticotropin-releasing hormone by enterochromaffin cells in human colon. *Gastroenterology*, (1994), 106:859-865.
- Kawana, T., Nada, O., Hirose, R., Ikeda, K., Goto, S., Taguchi, T., Kubota, M., Toyohara, T., Suita, S.** Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in normoganglionic and aganglionic segments of human colon. *Acta Neuropathol*, (1990), 80:469-474.
- Kelly, R.B.** Pathways of protein secretion in eukaryotes. *Science*, (1985), 230:25-32.
- Kelly, R.W., Illingworth, P., Baldie, G., Leask, S., Brouwr, S., Calder, A.A.** Progesterone control of interleukin-8 production in endometrium and chorio-decidual cells underlies the role of neutrophil in menstruation and parturition. *Hum Reprod*, (1993), 9:253-258.
- Kenakin, T.** Agonist-receptor efficacy. II. Agonist trafficking of receptor signals. *Trends Pharmacol Sci*, (1995), 16:232-238.
- Kenakin, T.** The classification of seven transmembrane receptors in recombinant expression systems. *Pharmacol Rev*, (1996), 48:413-463.

- Kenakin, T.** Agonist-specific receptor conformations. *Trends Pharmacol Sci*, (1997), 18:416-417.
- Kenton, P., Johnson, P.M.** GTP-binding proteins associated with the human placental syncytiotrophoblast plasma membrane. *Placenta*, (1994), 15:1-11.
- Keranen, L.M., Dutil, E.M., Newton, A.C.** Protein kinase C is regulated *in vivo* by three functionally distinct phosphorylations. *Curr Biol*, (1995), 5:1394-1403.
- King, B.F., Menton, D.N.** Scanning electron microscopy of human placental villi from early and late in gestation. *Am J Obstet Gynecol*, (1975), 122:824-828.
- Khodr, G.S., Siler-Khodr, T.M.** Localization of luteinizing hormone releasing factor (LRF) in the human placenta. *Fertil Steril*, (1978a), 29:523-526.
- Khodr, G.S., Siler-Khodr, T.M.** The effect of luteinizing hormone-releasing factor on human chorionic gonadotropin secretion. *Fertil Steril*, (1978b), 30:301-302.
- Kirby, D.A., Koerber, S.C., Craig, A.G., Feinstein, R.D., Delmas, L., Brown, M.R., Rivier, J.E.** Defining structural requirements for neuropeptide Y receptors using truncated and conformationally restricted analogues. *J Med Chem*, (1993), 36:385-393.
- Kitani, T., Ishida, A., Okuno, S., Takeuchi, M., Kameshita, I., Fujisawa, H.** Molecular cloning of Ca^{2+} /Calmodulin-dependent protein kinase phosphatase. *J Biochem*, (1999), 125:1022-1028.
- Kleuss, C., Scherübl, Hescheler, J., Schultz, G., Wittig, B.** Different β subunits determine G protein interaction with transmembrane receptors. *Nature*, (1992), 358 :424-426.

- Kleuss, C., Scherübl, Hescheler, J., Schultz, G., Wittig, B.** Selectivity in signal transduction determined by γ subunits of heterotrimeric G proteins. *Science*, (1993), 259 :832-834.
- Kliman, H.J., Nestler, J.E., Sermasi, E., Sanger, J.M., Strauss III, J.F.** Purification, characterization, and *in vitro* differentiation of cytotrophoblasts from human term placenta. *Endocrinology*, (1986), 118:1567-1582.
- Knight, D.E., Baker, P.F.** The phorbol ester TPA increases the affinity of exocytosis for calcium in 'leaky' adrenal medullary cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA*, (1983), 160:98-100.
- Knoches, A.M., Doyle, L.W.** Long-term outcome of infants born preterm. *Baillières Clin Obstet Gynaecol*, (1993), 7:633-651.
- Koch, W.J., Hawes, B.E., Allen, L.F., Lefkowitz, R.J.** Direct evidence that Gi-coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by G $\beta\gamma$ activation of p21ras. *Proc Natl Acad Sci USA*, (1994), 91:12706-12710.
- Koide, H., Ogita, K., Kikkawa, U., Nishizuka, Y.** Isolation and characterization of the δ subspecies of protein kinase C from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, (1992), 89:1149-1153.
- Kolch, W., Heidecker, G., Kochs, G., Hummel, R., Vahidi, H., Mischak, H., Finkenzeller, G., Marmé, D., Rapp, U.R.** Protein kinase C α activates Raf-1 by direct phosphorylation. *Nature*, (1993), 364:249-252.

Kolbika, B.K., Kolbika, T.S., Daniels, K., Regan, J.W., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. Chimeric α_2 -, β_2 -adrenergic receptors: delineation of domains involved in effector coupling and ligand binding specificity. *Science*, (1988), 240:1310-1316.

Krause, J., Eva, C., Seeburg, P.H., Sprengel, R. Neuropeptide Y₁ subtype pharmacology of a recombinantly expressed neuropeptide receptor. *Mol Pharmacol*, (1992), 41:817-821.

Krieger, D.T. Placenta as a source of 'brain' and 'pituitary' hormones. *Biol Reprod*, (1982), 26:55-72.

Laatikainen, T., Saijonmaa, O., Salminen, K., Wahlstroem, T. Localization and concentrations of beta-endorphin and beta-lipotrophin in human placenta. *Placenta*, (1987a), 8:381-387.

Laatikainen, T., Virtanen, T., Räisänen, K., Wahlström, T. Immunoreactive corticotropin releasing factor and corticotropin in plasma during pregnancy, labor and puerperium. *Neuropeptides*, (1987b), 10:343-353.

Laatikainen, T., Virtanen, T., Kaaja, R., Salminen-Luppainen, K. Corticotropin-releasing hormone in maternal and cord plasma in pre-eclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, (1991), 39:19-24.

Laburthe, M., Chenut, B., Rouyer-Fessard, C., Tatemoto, K., Couvineau, A., Servin, A., Amiranoff, B. Interaction of peptide YY with intestinal epithelial plasma membranes: binding of the radioiodinated peptide. *Endocrinology*, (1986), 118:1910-1917.

- Lacroix, J.S., Änggård, A., Hökfelt, T., O'Hare, M.M.T., Fahrenkrug, J., Lundberg, J.M.** Neuropeptide Y: presence in sympathetic and parasympathetic innervation of the nasal mucosa. *Cell Tissue Res*, (1990), 259:119-128.
- Lafond, J., Auger, D., Fortier, J., Brunette, M.G.** Parathyroid hormone receptor in human placental syncytiotrophoblast brush border and basal plasma membranes. *Endocrinology*, (1988), 123:2834-2840.
- Lafond, J., Leclerc, M., Brunette, M.G.** Characterization of calcium transport by basal plasma membranes from human placental syncytiotrophoblast. *J Cell Physiol*, (1991), 148:17-23.
- Lambright, D.G., Noël, J.P., Hamm, H.E., Sigler, P.B.** Structural determinants for activation of the α -subunit of a heterotrimeric G protein, *Nature*, (1994), 369:621-628.
- Lambright, D.G., Sondeck, J., Bohm, A., Skiba, N.P., Hamm, H.E., Sigler, P.B.** The 2.0 Å structure of a heterotrimeric G protein. *Nature*, (1996), 379:311-319.
- Lange, K.** Microvillar Ca^{2+} signalling: a new view of an old problem. *J Cell Physiol*, (1998), 180:19-34.
- Larhammar, D., Bloomquist, A.G., Yee, F., Jazin, E., Yoo, H., Wahlestedt, C.** Cloning and functional expression of a human neuropeptide Y/ peptide YY receptor of the Y1 subtype. *J Biol Chem*, (1992), 267:10935-10938.
- Larhammar, D.** Evolution of neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide. *Regul Pept*, (1996), 62:1-11.
- Larsen, P., Kristen, P.** The neuropeptide Y (Y4) receptor is highly expressed in neurones of the rat dorsal vagal complex. *Mol Brain Res*, (1997), 48:1-6.

- Larsson, L.-I., Sundler, F., Håkanson, R., Pollock, H.G., Kimmel, J.R.** Localization of APP, a postulated new hormone, to a pancreatic endocrine cell type. *Histochemistry*, (1974), 42:377-382.
- Lau, S.H., Rivier, J., Vale, W., Kaiser, E.T., Kezdy, F.J.** Surface properties of an amphiphilic peptide hormone and of its analog: corticotropin-releasing factor and sauvagine. *Proc Natl Acad Sci USA*, (1983), 80:7070-7074.
- Lebrethon, M.C., Jaillard, C., Naville, D., Begeot, M., Saez, J.M.** Regulation of corticotropin and steroidogenic enzyme mRNAs in human fetal adrenal cells by corticotropin, angiotensin-II and transforming growth factor beta 1. *Mol Cell Endocrinol*, (1994), 106:137-143.
- Lechleiter, J.D., Clapham, D.E.** Molecular mechanisms of intracellular calcium excitability in *X. laevis* oocytes. *Cell*, (1992), 69:283-294.
- Lee, C.C., Miller, R.J.** Is there really an NPY Y₃ receptor? *Regul Pept*, (1998), 75-76:71-78.
- Lee, Y., Shiosoka, S., Emson, P.C., Powell, J.F., Smith, A.D., Tohyama, M.** Neuropeptide Y-like immunoreactive structures in the rat stomach with special reference to the noradrenaline neuron system. *Gastroenterology*, (1985), 89:118-126.
- Lee, C.W., Lee, K.H., Lee, S.B., Park, D., Rhee, S.G.** Regulation of phospholipase C- β 4 by ribonucleotides and the α subunit of G_q. *J Biol Chem*, (1994), 269:25335-25338.
- Leff, P., Scaramellini, C., Law, C., McKechnie, K.** A three-state receptor model of agonist action. *Trends Pharmacol Sci*, (1997), 18:355-362.

- Le Good, J.A., Ziegler, W.H., Parekh, D.B., Alessi, D.R., Cohen, P., Parker, P.J.** Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science*, (1998), 281:2042-2045.
- Leiser, R., Luckhardt, M., Kaufmann, P., Winterhager, E., Bruns, U.** The fetal vascularisation of term human placental villi. I. Peripheral stem villi. *Anat Embryol*, (1985), 173:71-80.
- Lemaire, S., Valette, A., Chouinard, L., Dupuis, N., Day, R., Porthè, G., Cross, J.** Purification of multiple forms of dynorphin in human placenta. *Neuropeptides*, (1983), 3:181-191.
- Leopoldt, D., Hanck, T., Exner, T., Maier, U., Wetzker, R., Nürnberg, B.** G β γ stimulates phosphoinositide 3-kinase- γ by direct interaction with two domains of the catalytic p110 subunit. *J Biol Chem*, (1998), 273:7024-7029.
- Leppert, P.C.** Cervical softening, effacement and dilatation: a complex biochemical cascade. *J Maternal Fetal Med*, (1992), 213-223.
- Lev, S., Moreno, H., Martinez, R., Canoll, P., Peles, E., Musacchio, J.M., Plowman, G.D., Rudy, B., Schlessinger, J.** Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca(2+)-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature*, (1995), 376:737-745.
- Lewis, T.s., Shapiro, P.S., Ahn, N.G.** Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res*, (1998), 74:49-139.
- Li, N., Batzer, A., Daly, R., Yajnik, V., Skolnik, E., Chardin, P., Bar-Sagi, D., Margolis, B., Schlessinger, J.** Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signalling. *Nature*, (1993), 363:85-88.

- Liaw, C.W., Lovenberg, T.W., Barry, G., Oltersdorf, T., Grigoriadis, D.E., de Souza, E.B.** Cloning and characterization of the human corticotropin-releasing factor-2 receptor complementary deoxyribonucleic acid. *Endocrinology*, (1996), 137:72-77.
- Liggins, G.C., Fairclough, R.J. Grieves, S.A., Kendall, J.Z., Knox, B.S.** The mechanism of initiation of parturition in the ewe. *Recent Prog Horm Res*, (1973), 29:111-159.
- Liggins, G.C.** The role of cortisol in preparing the fetus for birth. *Reprod Fertil Dev*, (1994), 6:141-150.
- Lin, E.C., Cantiello, H.F.** A novel method to study the electrodynamic behavior of actin filaments: evidence for cable-like properties of actin. *Biophys J*, (1993), 65:1371-1378.
- Lin, L.L., Wartmann, M., Lin, A.Y., Knopf, J.L., Seth, A., Davis, R.J.** cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell*, (1993), 72:269-278.
- Linton, E.A., Wolfe, C.D.A., Behan, D.P., Lowry, P.J.** A specific carrier substance for human corticotropin-releasing factor in late gestational maternal plasma which could mask the ACTH-releasing activity. *Clin Endocrinol*, (1988), 28:315-322.
- Linton, E.A., Perkins, A.V., Woods, R.J., Eben, F., Wolfe, C.D.A., Behan, D.P., Potter, E., Vale, W., Lowry, P.J.** Corticotropin releasing hormone-binding protein (CRH-BP): plasma levels decrease during third trimester of normal human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*, (1993), 76:260-262.
- Liotta, A.S., Houghten, R., Krieger, D.T.** Identification of a beta-endorphin-like peptide in cultured human placental cells. *Nature*, (1982), 295:593-595.

- Lisanti, M.P., Scherer, P.E., Tang, Z., Sargiacomo, M.** Caveolae, caveolin-rich membrane domains: a signaling hypothesis. *Trends Cell Biol*, (1994), 4:231-135.
- Liu, J.P., Engler, D., Funder, J.W., Robinson, P.J.** Arginine vasopressin (AVP) causes the reversible phosphorylation of the myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) protein in the ovine anterior pituitary: evidence that MARCKS phosphorylation is associated with adrenocorticotropin (ACTH) secretion. *Mol Cell Endocrinol*, (1994), 101:247-256.
- Lobaugh, L., Blackshear, P.** Neuropeptide Y binding and inhibition of cAMP accumulation in human neuroepithelioma cells. *Am J Physiol*, (1990), 258:C913-C922
- Lohse, M.S., Blüml, K., Danner, S., Krasel, C.** Regulators of G-protein-mediated signalling. *Biochem Soc Trans*, (1996), 975-980.
- Lopez-Bernal, A., Craft, I.L.** Corticosteroid metabolism in vitro by human placenta, fetal membranes and decidua in early and late gestation. *Placenta*, (1981), 2:279-285.
- Lopez-Ilacasa, M., Crespo, P., Pellici, P.G., Gutkind, J.S., Wetzker, R.** Linkage of the G-protein coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase γ . *Science*, (1997), 275:394-397.
- Lovenberg, T.W., Liaw, C.W., Grigoriadis, D.E., Clevenger, W., Chalmers, D.T., De Souza, E.B., Oltersdorf, T.** Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin-releasing factor receptor subtype from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, (1995), 92:836-840.
- Lowenstein, E.J., Daly, R.J., Batzer, A.G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Skolnik, E.Y., Bar-Sagi, D., Schlessinger, J.** The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell*, (1992), 70:431-442.

- Ludowyke, R.I., Scurr, L.L., McNally, C.M.** Calcium ionophore-induced secretion from mast cells correlates with myosin light chain phosphorylation by protein kinase C. *J Immunol*, (1996), 157:5130-5138.
- Ludwig, H.** Surface structure of the human term placenta and the uterine wall *post partum* in the screen scan electron microscope. *Am J Obstet Gynecol*, (1971), 111:328-344.
- Lundberg, J.M., Tatemoto, K.** Pancreatic polypeptide family (APP, BPP, NPY, PYY) in relation to sympathetic vasoconstriction resistant to α -adrenoceptor blockade. *Acta Physiol Scand*, (1982), 116:393-402.
- Lundberg, J.M., Martinson, A., Hemsén, A., Theodorsson-Norheim, E., Svedenhag, J., Ekblom, E., Hjemdahl, P.** Corelease of neuropeptide Y and catecholamines during physical exercise in man. *Biochem Biophys Res Commun*, (1985), 133:30-36.
- Lundell, I., Blomqvist, A.G., Berglund, M., Schober, D.A., Johnson, D., Statnick, M.A., Ganski, R., Gehlert, D.R., Larhammar, D.** Cloning of a human receptor of the NPY receptor family with high affinity for pancreatic polypeptide and peptide YY. *J Biol Chem*, (1995), 270:29123-29128.
- Lundell, I., Statnick, M.A., Johnson, D., Schober, D.A., Starbäck, P., Gehlert, D.R., Larhammar, D.** The cloned rat pancreatic polypeptide receptor exhibits profound differences to the orthologous human receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, (1996), 93:5111-5115.

- Luttrell, L.M., Ostrowski, J., Cotecchia, S., Kendall, H., Lefkowitz, R.J.** Antagonism of catecholamine receptor signaling by expression of cytoplasmic domains of the receptors. *Science*, (1993), 259:1453-1457.
- Luttrell, L.M., Hawes, B.E., van Biesen, T., Luttrell, D.K., Lansing, T.J., Lefkowitz, R.J.** Role of c-SRC tyrosine kinase in G-protein-coupled receptor and G $\beta\gamma$ subunit-mediated activation of mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem*, (1996), 271:19443-19450.
- Luttrell, L.M., Della Rocca, G.J., van Biesen, T., Luttrell, D.K., Lefkowitz, R.J.** G $\beta\gamma$ subunits mediated Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor: ascaffold for G protein-coupled receptor-mediated Ras activation. *J Biol Chem*, (1997), 272:4637-4644.
- MacCannell, K.L., Lederis, K., Hamilton, P.L., Rivier, J.** Amunine (ovine CRF), urotensin I and sauvagine, three structurally related peptides, produce selective dilatation of the mesenteric circulation. *Pharmacol*, (1982), 25:116-120.
- MacFadyen, R.J., Allen, J.M., Bloom, S.R.** NPY stimulates net absorption across rat intestinal mucosa *in vivo*. *Neuropeptides*, (1986), 7:219-227.
- MacLennan, A.H., Green, R.C., Bryant-Greenwood, G.D., Greenwood, F.C., Seamark, R.F.** Ripening of the cervix, induction of labor with purified porcine relaxin. *Lancet*, (1980), 1:220-223
- Maggi, M., Baldi, E., Susini, T.** Hormonal and local regulation of uterine activity during parturion. I. the oxytocin system. *J Endocrinol Invest*, (1994), 17:739-756.

Magiakou, M., Mastorakos, G., Rabin, D., Margioris, A.N., Dubbert, B., Calogero, A.E., Tsigos, C., Munson, P.J., Chrousos, G.P. The maternal hypothalamic-pituitary-adrenal axis in third trimester human pregnancy. *Clin Endocrinol*, (1996), 44:419-428.

Maier, U., Babich, A., Nürnberg, B. Roles of non-catalytic subunits in gbetagamma-induced activation of class I phosphoinositide 3-kinase isoforms beta and gamma. *J Biol Chem*, (1999), 274:29311-29317.

Majzoub, J.A., Karalis, K.P. Placental corticotropin-releasing hormone: fonction and regulation. *Am J Obstet Gynecol*, (1999), 180:S242-S246.

Majzoub, J.A., McGregor, J.A., Lockwood, C.J., Smith, R., Taggart, M.S., Schulkin, J. A central theory of preterm and term labor: putative role for corticotropin-releasing hormone. *Am J Obstet Gynecol*, (1999), 180:S232-S241.

Makrigiannakis, A., Margioris, A., Markogiannakis, E., Stournaras, C., Gravanis, A. Steroid hormones regulate the release of immunoreactive β -endorphin from the Ishikawa human endometrial cell line. *J Clin Endocrinol Metab*, (1992), 75:584-589.

Makrigiannakis, A., Margioris, A.N., Le Goascogne, C., Zoumakis, E., Nikas, G., Stournaras, C., Psychoyos, A., Gravanis, A. corticotropin-releasing hormone (CRH) is expressed at the implantation sites of early pregnant rat uterus. *Life Sci*, (1995a) 57:1869-1875.

Makrigiannakis, A., Zoumakis, E., Margioris, A.N., Theodoropoulos, P., Stournaras, C., Gravanis, A. The corticotropin-releasing hormone in normal and tumoral epithelial cells of human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*, (1995b), 80:185-189.

- Malassine, A., Goldstein, S., Alsat, E., Merger, C., Cedard, L.** Ultrastructural localization of low density lipoprotein bindings site on the surface of the syncytial microvillous membranes of the human placenta. *IRCS Med Sci*, (1984), 12:166-167.
- Mannon, P.J., Raymond, J.R.** The neuropeptide Y/peptide YY Y1 receptor is coupled to MAP kinase via PKC and Ras in CHO cells. *Biochem Biophys Res Comm*, (1998), 246:91-94.
- Marchant, J.S., Taylor, C.W.** Rapid activation and partial inactivation of inositol triphosphate receptors by inositol trisphosphate. *Biochemistry*, (1998), 37:11524-11533.
- Marshall, I.C., Taylor, C.W.** Two calcium-binding sites mediate the interconversion of liver inositol 1,4,5-trisphosphate receptors between three conformational states. *Biochem J*, (1994), 301:591-598.
- Margioris, A.N., Grino, M., Protos, P., Gold, P.W. Chrousos G.P.** Corticotropin-releasing hormone and oxytocin stimulate the release of placental proopiomelanocortin peptides. *J Clin Endocrinol Metab*, (1988), 66:922-926.
- Marinoni, E., Korebrits, C., Di Iorio, R., Cosmi, E.V., Challis, J.R.G.** Effect of beametasone in vivo on placental corticotropin-releasing hormone in human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, (1998), 178:770-778.
- Martin, T.F.** The molecular machinery for fast and slow neurosecretion. *Curr Opin Neurobiol*, (1994), 4:626-632.
- Martling, C.R., Matran, R., Alving, K., Hökfelt, T., Lundberg, J.M.** Innervation of lower airways and neuropeptide effects on bronchial and vascular tone. *Cell Tissue Res*, (1990), 260:223-233.

- Mason, M.J., Mahaut-Smith, M.P., Grinstein, S.** The role of intracellular Ca^{2+} in the regulation of plasma membrane Ca^{2+} permeability of unstimulated rat lymphocytes. *J Biol Chem*, (1991), 266:10872-10879.
- Mastorakos, G., Webster, E.L., Friedman, T.C., Chrousos, G.P.** Immunoreactive corticotropin-releasing hormone and its binding sites in the rat ovary. *J Clin Invest*, (1993), 92:961-968.
- Mastorakos, G., Scopa, C.D., Kao, L.C., Vryonidou, A., Friedman, T.C., Kattis, D., Phenekos, C., Rabin, D., Chrousos, G.P.** Presence of immunoreactive corticotropin-releasing hormone in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*, (1996), 81:1046-1050.
- Matovcik, L.M., Rhee, S.S., Schaefer, J.F., Kinder, B.K.** Reconstitution of calcium-regulated parathyroid hormone secretion from streptolysin-O-permeabilized parathyroid cells by guanosine 5'-O-(thio)triphosphate. *Endocrinology*, (1997), 138:1170-1179.
- Matsubara, S., Tamada, T., Saito, T.** Ultracytochemical localizations of adenylate cyclase, guanylate cyclase and cyclic 3', 5'-nucleotide phosphodiesterase activity on the trophoblast in the human placenta. *Histochemistry*, (1987a), 87:505-509.
- Matsubara, S., Tamada, T., Saito, T.** Ultracytochemical localizations of alkaline phosphatase and acid phosphatase activities in the human term placenta. *Acta Histochem Cytochem*, (1987b), 20:283-294.
- Matsumoto, N., Nomura, T., Momose, K., Ikeda, Y., Kondou, Y., Akiho, H., Togami, J., Kimura, Y., Okada, M., Yamaguchi, T.** Inactivation of a novel neuropeptide Y-peptide YY receptor gene in primate species. *J Biol Chem*, (1996), 271:27217-27220.

- Matsumoto, K., Ebihara, K., Yamamoto, H., Tabuchi, H., Fukunaga, K., Yasunami, M., Ohkubo, H., Shichiri, M., Miyamoto, E.** Cloning from insulinoma cells of synapsin I associated with insulin secretory granules. *J Biol Chem*, (1999), 274:2053-2059.
- Matthews, S.G., Heavens, R.P., Sirinathsinghji, D.J.** Cellular localization of corticotropin releasing factor mRNA in the ovine brain. *Brain Res Mol Brain Res*, (1991), 11:171-176.
- McCormick, M.G.** The contribution of low birth weight to infant mortality and childhood morbidity. *New Engl J Med*, (1985), 312:82-90.
- McCullough, L.A., Egan, T.M., Westfall, T.C.** Neuropeptide Y inhibition of calcium channels in PC-12 pheochromocytoma cells. *Am J Physiol*, (1998), 274:C1290-C1297.
- McGregor, J., Barret, J., Hasting, C.** Diurnal variation of salivary estriol in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, (1997), 176: S56.
- McLean, M., Bisit, A., Davies, J., Woods, R., Lowry, P.J., Smith, R.** A placental clock controlling the length of human pregnancy. *Nat Med*, (1995), 1:460-463.
- McLean, M., Bisit, A., Davies, J., Walters, W., Hackshaw, A., De Voss, K., Smith, R.** Predicting risk of preterm delivery by second-trimester measurement of maternal plasma corticotropin-releasing hormone and α -fetoprotein concentrations. *Am J Obstet Gynecol*, (1999), 181:207-215.
- Mecenas, C.A., Giussani, D.A., Owiny, J.R., Jenkins, S.L., Wu, W.X., Honnebier, B.O., Lockwood, C.J., Kong, L., Guller, S., Nathanielsz, P.W.** Production of premature delivery in pregnant rhesus monkeys by androstenedione infusion. *Nat Med*, (1996), 2:443-448.

- Medeiros, M.D.S., Turner, A.J.** Metabolism and functions of neuropeptide Y. *Neurochem Res*, (1996), 21:1125-1132.
- Medkova, M., Cho, W.** Differential membrane-binding and activation mechanisms of protein kinase C-alpha and -epsilon. *Biochemistry*, (1998), 37:4892-4900.
- Mellor, H., Parker, P.J.** The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J*, (1998), 332:281-292.
- Mentlein, R., Dahms, P., Grandt, D., Krüger, R.** Proteolytic processing of neuropeptide Y and peptide YY by dipeptidyl peptidase IV. *Regul Pept*, (1993), 49:133-144.
- Merritt, J.E., Armstrong, W.P., Benham, C.D., Hallam, T.J., Jacob, R., Jaxachamiec, A., Leigh, B.K., McCarthy, S.A., Moores, K.E., Rink, T.J.** SK&F 96365, a novel inhibitor of receptor-mediated calcium entry. *Biochem J*, (1990), 271:515-522.
- Mersol-Barg, M.S., Kurt, F.M., Choi, C.M., Lee, A.C., Kim, M.N.** Inhibin supresses human chorionic gonadotropin in term, but not first trimester, placenta. *J Clin Endocrinol Metab*, (1990), 71:1294-1298.
- Mesiano, S., Jaffe, R.B.** Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. *Endocr Rev*, (1997), 18:378-403.
- Meuris, S., Polliotti, B., Robyn, C., Lebrun, P.** Ca²⁺ entry through L-type voltage-sensitive Ca²⁺ channels stimulates the release of human chorionic gonadotrophin and placental lactogen by placental explants. *Biochim Biophys Acta*, (1994), 1220:101-106.
- Meyer, T., Hanson, P.I., Stryer, L., Schulman, H.** Calmodulin trapping by calcium-calmodulin-dependent protein kinase. *Science*, (1992), 256:1199-1202.

- Michel, M.C., Schlicker, E., Fink, K., Boublik, J.H., Göthert, M., Willette, R.N., Daly, R.N., Hieble, J.P., Rivier, J.E., Motulsky, H.J.** Distinction of NPY receptors *in vitro* and *in vivo*. I. NPY-(18-36) discriminates NPY receptor subtypes *in vitro*. *Am J Physiol*, (1990), 259:E131-E139.
- Michel, M.C., Beck-Sinkinger, A., Cox, H., Doods, H.N., Herzog, H., Larhammar, D., Quirion, R., Schwartz, T., Westfall, T.** XVI. International union of pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors. *Pharmacol Rev*, (1998), 50:143-150.
- Mihara, S., Shigeri, Y., Fujimoto, M.** Neuropeptide Y-induced intracellular Ca^{2+} increases in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett*, (1989), 259:79-82.
- Mikoshiha, K., Fukuda, M., Iyata, K., Kabayama, H., Mizutani, A.** Role of synaptotagmin, a Ca^{2+} and inositol polyphosphate binding protein, in neurotransmitter release and neurite outgrowth. *Chem Phys Lipids*, (1999), 98:59-67.
- Millar, B.C., Weis, T., Piper, H.M., Weber, M., Borchard, U., McDermott, B.J., Balasubramaniam, A.** Positive and negative contractile effects of neuropeptide Y on ventricular cardiomyocytes. *Am J Physiol*, (1991), 261:H1727-H1733.
- Miller, S.G., Kennedy, M.B.** Regulation of brain type II Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: a Ca^{2+} -triggered molecular switch. *Cell*, (1986), 44:861-870.
- Mintz, I.M., Venema, V.J., Swiderek, K., Lee, T., Bean, B.P., Adams, M.E.** P-type Ca^{2+} channels blocked by the spider toxin ω -Aga-IVA. *Nature*, (1992), 355:827-829.

- Missiaen, L., Taylor, C.W., Berridge, M.J.** Luminal Ca^{2+} promoting spontaneous Ca^{2+} release from inositol triphosphate-sensitive stores in rat hepatocytes. *J Physiol*, (1992), 455:623-640.
- Mixon, M.B., Lee, E., Coleman, D.E., Berghuis, A.M., Gilman, A.G., Sprang, S.R.** Tertiary and quaternary structural changes in $G_{\alpha i1}$ induced by GTP hydrolysis. *Science*, (1995), 270:954-960.
- Mochly-Rosen, D., Gordon, A.S.** Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. *FASEB J*, (1998), 12:35-42.
- Mohlig, M., Wolter, S., Mayer, P., Lang, J., Osterhoff, M., Horn, P.A., Schatz, H., Pfeiffer, A.** Insulinoma cells contain an isoform of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II delta associated with insulin secretion vesicles. *Endocrinology*, (1997), 138:2577-2584.
- Monkawa, T., Miyawaki, A., Sugiyama, T., Yoneshima, H., Yamamoto-Hino, M., Furuichi, T., Saruta, T., Hasegawa, M., Mikoshiba, K.** Heterotetrameric complex formation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor subunits. *J Biol Chem*, (1995), 270:14700-14704.
- Morgan, J.L., Curran, T.** Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Ann Rev Neurosci*, (1991), 14:421-451.
- Morgan, A.** Exocytosis. *Essays Biochem*, (1995), 30:77-95.

Morikawa, H., Fukuda, K., Mima, H., Shoda, T., Kato, S., Mori, K. Tyrosine kinase inhibitors suppress N-type and T-type Ca²⁺ channel currents in NG108-15 cells. *Pflugers Arch*, (1998), 436:127-132.

Mormede, P., Castagne, V., Rivet, J.M., Gaillard, R., Corder, R. Involvement of neuropeptide Y in neuroendocrine stress responses. Central and peripheral studies. *J Neural Transm*, (1990), 29 (Suppl):65-75.

Morris, J.L., Murphy, R. Evidence that neuropeptide Y released from noradrenergic axons causes prolonged contraction of the guinea-pig uterine artery. *J Auton Nerv Syst*, (1988), 24:241-249.

Morrish, D.W., Bhardwaj, D., Paras, M.T. Transforming growth factor- β 1 inhibits placental differentiation and human chorionic gonadotropin and human placental lactogen secretion. *Endocrinology*, (1991), 129:22-26.

Morrish, D.W., Dakour, J, Li, H. Functional regulation of human trophoblast differentiation. *J Reprod Immunol*, (1998), 39:179-195.

Mosior, M., Newton, A.C. Mechanism of interaction of protein kinase C with phorbol esters. Reversibility and nature of membrane association. *J Biol Chem*, (1995), 270:25526-25533.

Motulsky, H., Michel, M. Neuropeptide Y mobilizes Ca²⁺ and inhibits adenylate cyclase in human erythroleukemia cells. *Am J Physiol*, (1988), 255:E880-E885.

Muglia, L., Jacobson, L., Dikkes, P., Majzoub, J.A. Corticotropin-releasing hormone deficiency reveals major fetal but not adult glucocorticoid need. *Nature*, (1995), 373:427-432.

Murakami, K., Chan, S.Y., Routtenberg, A. Protein kinase C activation by cis-fatty acid in the absence of Ca²⁺ and phospholipids. *J Biol Chem*, (1986), 261:15424-15429.

Myers, M.G.Jr., Wang, L.M., Sun, X.J., Zhang, Y., Yenush, L., Schlessinger, J., Pierce, J.H., White, M.F. Role of IRS-1-GRB-2 complexes in insulin signaling. *Mol Cell Biol*, (1994), 14:3577-3587.

Myrsen, U., Sundler, F. Neuropeptide Y is expressed in islet somatostatin cells of the hamster pancreas: a combined immunochemical and *in situ* hybridization study. *Regul Pept*, (1995), 57:65-76.

Nakamura, M., Sakanada, C., Aoki, Y., Ogasawara, H., Tsuji, T., Kodama, H., Matsumoto, T., Shimizu, T., Noma, M. Identification of two isoforms of mouse neuropeptide Y-Y1 receptor generated by alternative splicing: Isolation, genomic structure, and functional expression of the receptors. *J Biol Chem*, (1995), 270:30102-30110.

Nakamura, M., Aoki, Y., Hirano, D. Cloning and functional expression of a cDNA encoding a mouse type 2 neuropeptide Y receptor. *Biochim Biophys Acta*, (1996), 1284:134-137.

Nakanishi, H., brewer, K.A., Exton, J.H. Activation of the α isozyme of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate. *J Biol Chem*, (1993), 268:13-16.

Nathanielsz, P.W., Giussani, D.A., Mecnas, C.A., Wu, W., Winter, J.A., Garcia-Villar, R., Baguma-Nibasheka, M., Honnebier, M.B., McDonald, T.J. Regulation of the switch from myometrial contractures to contractions in late pregnancy: studies in the pregnant sheep and monkey. *Reprod Fertil Dev*, (1995), 7:595-602.

Nathansson, M.H. Cellular and subcellular calcium signaling in gastrointestinal epithelium. *Gastroenterology*, (1994), 106:1349-1364.

Ne'eman, Z., Gonik, B., Goshen, R., Rachmilewitz, J., Ariel, I., Rosenmann, E., Weinstein, D., de Groot, N., Hochberg, A. Ultrastructural characteristics of cytotrophoblast cells during stages of differentiation. *J Submicrosc Cytol Pathol*, (1994), 26:341-346.

Neer, E.J. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell*, (1995), 249-257.

Nemoz-Gaillard, E., Cordier-Bussat, M., Filloux, C., Cuber, J.C., Van Obberghen, E., Chayvialle, J.A., Abello, J. Bombesin stimulates cholecystokinin secretion through mitogen-activated protein-kinase-dependent and -independent mechanisms in the enteroendocrine STC-1 cell line. *Biochem J*, (1998), 331:129-135.

Neubig, R.R. Membrane organization in G-protein mechanisms. *FASEB J*, (1994), 8:939-946.

Neudeck, H., Joncic, M., Schuster, C., Bisson, S., Hildebrandt, R., Öney, T., Stiemer, B., Hopp, H., Graf, R. Histochemical evaluation of placental dipeptidyl peptidase IV (CD26) in pre-eclampsia: enzyme activity in villous trophoblast indicates an enhanced likelihood of gestational hypertensive disorders. *Am J Reprod Immunol*, (1997), 37:449-458.

Newton, A.C. Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem*, (1995), 270:28495-28498.

Ni, X., Chan, E.G., Fitter, J.T., Smith, R. Nitric oxide inhibits corticotropin-releasing hormone exocytosis but not synthesis by cultured human trophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab*, (1997), 82:4171-4175.

- Nishihira, M., Yagihashi, S.** Simultaneous, detection of immunoreactive hCG- and somatostatin-containing cells and their gestational changes in the human placental villi and decidua. *Acta Histochem Cytochem*, (1979), 12:434-442.
- Nishimura, E., Billestrup, N., Perrin, M., Vale, W.** Identification and characterization of a pituitary corticotropin-releasing factor binding protein by chemical cross-linking. *J Biol Chem*, (1987) 262:12893-12896.
- Nishizuka, Y.** Intracellular signalling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*, (1992), 258:607-614.
- Nolten, W.E., Ruekert, P.A.** Elevated free cortisol index in pregnancy: possible regulatory mechanisms. *Am J Obstet Gynecol*, (1981), 139:492-498.
- Nörenberg, W., Bek, M., Limberger, N., Takeda, K., Illes, P.** Inhibition of nicotinic acetylcholine receptor channels in bovine adrenal chromaffin cells by Y₃-type neuropeptide Y receptors via the adenylate cyclase/protein kinase A system. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, (1995), 351:337-347.
- Nürnberg, B., Gudermann, T., Schultz, G.** Receptor and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 2. G proteins: structure and function. *J Mol Med*, (1995), 73:123-132.
- Ny, L., Grundemar, L.** Inhibition of stimulated cyclic AMP production by multiple neuropeptide Y receptors in the rat brainstem. *Neurosci Lett*, (1997), 221:113-116.
- Obejero-Paz, C.A., Auslender, M., Scarpa, A.** PKC activity modulates availability and long openings of L-type Ca²⁺ channels in A7r5 cells. *Am J Physiol*, (1998), 275:C535-C543.

- Obukhov, A.G., Harteneck, C., Zobel, A., Harhammer, R., Kalkbrenner, F., Leopoldt, D., Luckhoff, A., Nurnberg, B., Schultz, G.** Direct activation of trp1 cation channels by G α 11 subunits. *EMBO J*, (1996), 15:5833-5838.
- Odagiri, E.D., Sherrell, B.J., Mount, C.D., Nicholson, W.E., Orth, D.N.** Human placental immunoreactive corticotropin, lipotropin and beta-endorphin: evidence for a common precursor. *Proc Natl Acad Sci USA*, (1971), 76:2027-2032.
- Offermanns, S., Shultz, G.** Complex information processing by the transmembrane signaling system involving G proteins. *Naynyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, (1994), 350:329-338.
- Offermanns, S., Simon, M.I.** Organization of transmembrane signalling by heterotrimeric G proteins. *Cancer Surveys*, (1996), 27:177-198.
- Ogita, K., Miyamoto, S., Yamaguchi, K., Koide, H., Fujisawa, N., Kikkawa, U., Sahara, S., Fukami, Y., Nishizuka, Y.** Isolation and characterization of the ϵ -subspecies of protein kinase C from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, (1992), 89:1592-1596.
- Ohashi, M., Carr, B.R., Simpson, E.R.** Effects of adrenocorticotrophic hormone on low density lipoprotein receptors of human fetal adrenal tissue. *Endocrinology*, (1981), 108:1237-1242.
- Okamoto, E., Takagi, T., Makino, T., Sata, H., Iwata, I., Nishino, E., Mitsuda, N., Sugita, N., Otsuki, Y., Tanazawa, O.** Immunoreactive corticotropin-releasing hormone, adrenocorticotropin and cortisol in human plasma during pregnancy and delivery and postpartum. *Horm Metab Res*, (1989), 21:566-572.

- Onaran, H.O., Costa, T.** Agonist efficacy and allosteric models of receptor action. *Ann New York Acad Sci*, (1997), 812:98-115.
- Oomori, Y., Okuno, S., Fujisawa, H., Iuchi, H., Ishikawa, K., Satoh, Y., Ono, K.** Ganglion cells immunoreactive for catecholamine-synthesizing enzymes, neuropeptide Y, and vasoactive intestinal polypeptide in rat adrenal gland. *Cell Tissue Res*, (1994), 275:201-213.
- Orth, D.N., Mount, C.D.** Specific high-affinity binding protein for human corticotropin-releasing hormone in normal human serum. *Biochem Biophys Res Commun*, (1987), 143:411-417.
- Orth, D.N.** Corticotropin-releasing hormone in humans. *Endocr Rev*, (1992), 13:164-191.
- Ou, C.W., Orsino, A., Lye, S.J.** Expression of connexin-43 and connexin-26 in the rat myometrium during pregnancy and labor is differentially regulated by mechanical and hormonal signals. *Endocrinology*, (1997), 138:5398-5407.
- Overbeck, A.F., Brtva, T.R., Cox, A.D., Graham, S.M., Huff, S.Y., Khosravi-Far, R., Quilliam, L.A., Solski, P.A., Der, C.J.** Guanine nucleotide exchange factors: activators of Ras superfamily proteins. *Mol Reprod Dev*, (1995), 42:468-476.
- Pace, A.M., Faure, M., Bourne, H.R.** G(i)-mediated activation of the MAP kinase cascade. *Mol Biol Cell*, (1995), 6:1685-1695.

- Palmer, R.H., Schonwasser, D.C., Rahman, D., Pappin, D.J., Herget, T., Parker, P.J.** PRK1 phosphorylates MARCKS at the PKC sites: serine 152, serine 156 and serine 163. *FEBS Lett*, (1996), 378:281-285.
- Pappa, H., Murray-Rust, J., Dekker, L.V., Parker, P.J., McDonald, N.Q.** Crystal structure of the C2 domain from protein kinase C-delta. *Structure*, (1998), 6:885-894.
- Parekh, A.B., Penner, R.** Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev*, (1997), 77:901-930.
- Parker, S.L., Crowley, W.R.** Centrale stimulation of oxytocin release in the lactating rat: Interaction of neuropeptide Y with α_1 -adrenergic mechanisms. *Endocrinology*, (1993), 132:658-666.
- Parker, C.R. Jr., Faye-Petersen, O., Stankovic, A.K., Mason, J.L., Grizzle, W.E.** Immunohistochemical evaluation of the cellular localization and ontogeny of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-4 isomerase in the human fetal adrenal gland. *Endocr Res*, (1995), 21:69-80.
- Parker, L., Choi, J., Yao, Y.** Elementary events of InsP_3 -induced Ca^{2+} liberation in *Xenopus* oocytes : hot spots, puffs and blips. *Cell Calcium*, (1996), 20 :105-121.
- Parker, S.L., Parker, M.S., Sweatman, T., Crowley, W.R.** Characterization of G protein and phospholipase C-coupled agonist binding to the Y_1 neuropeptide Y receptor in rat brain: sensitivity to G protein activators and inhibitors and to inhibitors of phospholipase C. *J Pharmacol Exp Ther*, (1998), 286:382-391.
- Parkes, D.G., Yamamoto, G.Y., Vaughan, J.M., Vale, W.** Characterization and regulation of corticotropin-releasing factor in the human hepatoma NPLC-KC cell line. *Neuroendocrinology*, (1993), 57:663-669.

- Pasetto, N., Zicari, A., Piccione, E., Lenti, L., Pontieri, G., Ticconi, C.** Influence of labor and oxytocin on *in vitro* leukotriene release by human fetal membranes and uterine decidua at term gestation. *Am J Obstet Gynecol*, (1992), 166 :1500-1506.
- Paulesu, L., King, A., Loke, Y.W., Cintorino, M., Belizzi, E., Boraschi, D.** Immunohistochemical localization of IL-1 α and IL-1 β in normal human placenta. *Lymphokine Cytokine Res*, (1991), 10:443-448.
- Pavía, J., Munoz, M., Jiménez, E., Martos, F., Glez-Correa, J.A., De la Cruz, J.P., Garcia, V., de la Cuesta, F.S.** Pharmacological characterization and distribution of muscarinic receptors in human placental syncytiotrophoblast brush-border and basal plasma membranes. *Eur J Pharmacol*, (1997), 320:209-214.
- Pawson, T.** SH2 and SH3 domains in signal transduction. *Adv Cancer Res*, (1994), 4:25-30.
- Pepe, G.J., Waddell, B.J., Stahl, S.J., Albrecht, E.D.** The regulation of transplacental cortisol-cortisone metabolism by estrogen in pregnant baboons. *Endocrinology*, (1988), 122:78-83.
- Pepe, G.J., Albrecht, E.D.** Regulation of the primate fetal adrenal cortex. *Endocr Rev*, (1990), 11:151-176.
- Pepe, G.J., Albrecht, E.D.** Actions of placental and fetal adrenal steroid hormones in primate pregnancy. *Endocr Rev*, (1995), 16:608-648.
- Perkins, A.V., Eben, F., Wolfe, C.D., Schulte, H.M., Linton, E.A.** Plasma measurements of corticotrophin-releasing hormone-binding protein in normal and abnormal human pregnancy. *J Endocrinol*, (1993), 138:149-157.

- Perkins, A.V., Linton, E.A.** Identification and isolation of corticotropin-releasing hormone-positive cells from the human placenta. *Placenta*, (1995), 16:233-243.
- Perkins, A.V., Wolfe, C.D., Eben, F., Soothill, P., Linton, E.A.** Corticotropin-releasing hormone-binding protein in human fetal plasma. *J Endocrinol*, (1995) 146:395-401.
- Pernow, J., Lundberg, J.M., Kaijser, L., Hjemdahl, P., Theodorsson-Norheim, E., Martinsson, E., Pernow, B.** Plasma neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity and catecholamines during various degrees of sympathetic activation in man. *Clin Physiol*, (1986), 6:561-578.
- Pernow, J., Lundberg, J.M.** Release and vasoconstrictor effects of neuropeptide Y in relation to non-adrenergic sympathetic control of renal blood flow in the pig. *Acta Physiol Scand*, (1989), 136 :507-517.
- Perrin, M.H., Donaldson, C.J., Chen, R., Lewis, K.A., Vale, W.** Cloning and functional expression of a rat brain corticotropin releasing factor (CRF) receptor. *Endocrinology*, (1993), 133:3058-3061.
- Perrin, M., Donaldson, C., Chen, R., Blount, A., Berggren, T., Bilezikjian, L., Sawchenko, P., Vale, W.** Identification of a second corticotropin-releasing factor receptor gene and characterization of a cDNA expressed in heart. *Proc Natl Acad Sci USA*, (1995), 92:2969-2973.
- Petersen, C.C., Berridge, M.J.** The regulation of capacitative calcium entry by calcium and protein kinase C in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem*, (1994), 269:32246-32253.

- Petersen, C.C., Berridge, M.J.** G-protein regulation of capacitative calcium entry may be mediated by protein kinases A and C in *Xenopus* oocytes. *Biochem J*, (1995), 307:663-668.
- Petit, A., Gallo-Payet, N., Vaillancourt, C., Bellabarba, D., Lehoux, J.G., Belisle, S.** A role for extracellular calcium in the regulation of placental lactogen release by angiotensin-II and dopamine in human term trophoblastic cells. *J Clin Endocrinol Metab*, (1993), 77:670-676.
- Petit, A., Geoffroy, P., Bessette, P., Prevost, J., Belisle, S.** Expression of human placental G proteins during pregnancy. *J Soc Gynecol Investig*, (1995), 2:678-685.
- Petitto, J.M., Huang, Z., McCarthy, D.B.** Molecular cloning of NPY-Y1 receptor cDNA from rat splenic lymphocytes: evidence of low levels of mRNA expression and [¹²⁵I]NPY binding sites. *J Neuroimmunol*, (1994), 54:81-86.
- Petraglia, F., Sawchenko, P., Lim, A.T.W., Rivier, J., Vale, W.** Localization, secretion and action of inhibin in human placenta. *Science*, (1987a), 237:187-189.
- Petraglia, F., Sawchenko P.E., Rivier, J., Vale, W.** Evidence for local stimulation of ACTH secretion by corticotropin-releasing factor in human placenta. *Nature*, (1987b), 328:717-719.
- Petraglia, F., Lim, A.T.W., Vale, W.** Adenosine 3',5'-monophosphate, prostaglandins, and epinephrine stimulate the secretion of immunoreactive gonadotropin-releasing hormone from cultured human placental cells. *J Clin Endocrinol Metab*, (1987c), 65:1020-1025.

Petraglia, F., Vale, W. Chapter 13: Role of inhibin-related peptides in human placenta. In: Hodgen, G., Rosenwaks, Z. (eds): Nonsteroidal gonadal factors: physiological roles and possibilities in contraceptive development. Jones Institute Press, Norfolk VA. (1988), pp181-195.

Petraglia, F., Sutton, A.N., Vale, W. Neurotransmitters and peptides modulate the release of immunoreactive corticotropin-releasing factor from cultured human placental cells. *Am J Obstet Gynecol*, (1989a), 160:247-251.

Petraglia, F., Coukos, G., Battaglia, C., Bartolotti, A., Volpe, A., Segre, A., Genazzani, A.R. Plasma and amniotic fluid immunoreactive neuropeptide Y level changes during pregnancy, labor and at parturition. *J Clin Endocrinol Metab*, (1989b), 69:324-328.

Petraglia, F., Calzà, L., Giardino, L., Sutton, S., Marrama, P., Rivier A.R., Genazzani, A.R., Vale, W. Identification of immunoreactive neuropeptide- γ in human placenta: localization, secretion, and binding sites. *Endocrinology*, (1989c), 124:2016-2022.

Petraglia, F., Vaughan, J., Vale, W. Inhibin and activin modulate the release of GnRH, hCG, and progesterone from cultured human placental cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, (1989d), 86:5114-5117.

Petraglia, F., Calzà, L., Garuti, G.C., Abrate, M., Giardino, L., Ganazzani, A.R., Vale, W., Meunier, H. Presence and synthesis of inhibin subunits in human decidua. *J Clin Endocrinol Metab*, (1990a), 71:487-491.

- Petraglia, F., Garutti, G.C., Deramundo, B., Angioni, S., Genazzani, A., Bilezikjian, M.** Mechanisms of action of interleukin 1 β in increasing corticotrophin-releasing factor and adrenocorticotrophin hormone released from cultured human placental cells. *Am J Obstet Gynecol*, (1990b), 163:1307-1312.
- Petraglia, F., Giardino, L., Coukos, G., Calzà, L., Vale, W., Genazzani, A.** Corticotropin-releasing factor and parturition: plasma and amniotic fluid levels and placental binding sites. *Obstet Gynecol*, (1990c), 75 :784-789.
- Petraglia, F., Garuti, G.C., Calzà, L., Robert, V., Giardino, L., Ganazzani, A.R., Vale, W.** Inhibin subunits in human placenta: localization and messenger ribonucleic acid levels during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, (1991), 165:750-755.
- Petraglia, F., Tabanelli, S., Galassi, M.C., Garuti, G.C., Mancini, A.C., Genazzani, A.R., Gurpide, E.** Human decidua and *in vitro* decidualized endometrial stromal cells at term contain immunoreactive corticotropin-releasing factor (CRF) and CRF messenger ribonucleic acid. *J Clin Endocrinol Metab*, (1992), 74:1427-1431.
- Petraglia, F., Calzà, L., Giardino, L., Zanni, M., Florio, P., Ferrari, A.R., Nappi, C., Ganazzani, A.R.** Maternal decidua and fetal membranes contain immunoreactive neuropeptide Y. *J Endocrinol Invest*, (1993a), 16:201-205.
- Petraglia, F., Anceschi, M.M., Calzà, L., Garuti, G.C., Fusaro, P., Giardino, L., Ganazzani, A.R., Vale, W.** Inhibin and activin in human fetal membranes: evidence for a local effect on prostaglandin release. *J Clin Endocrinol Metab*, (1993b), 77:542-546.
- Petraglia, F., Gallinelli, A., Grande, A., Florio, P., Ferrari, S., Ganazzani, A.R., Ling, N., DePaolo, V.** Local production and action of follistatin in human placenta. *J Clin Endocrinol Metab*, (1994), 78:205-210.

- Petraglia, F., Aguzzoli, L., Florio, P., Baumann, P., Genazzani, A.R., Di Carlo, C., Romero, R.** Maternal plasma and placental immunoreactive corticotropin-releasing factor concentrations in infection-associated term and pre-term delivery. *Placenta*, (1995), 16:157-164
- Petraglia, F., Florio, P., Nappi, C., Genazzani, A.R.** Peptide signaling in human placenta and membranes: autocrine, paracrine, and endocrine mechanisms. *Endocr Rev*, (1996), 17:156-186.
- Petraglia, F., Santuz, M., Florio, P., Simoncini, T., Luisi, S., Plaino, L., Ganazzani, A.R., Ganazzani, A.D., Volpe, A.** Paracrine regulation of human placenta: control of hormonogenesis. *J Reprod Immunol*, (1998), 39:221-233.
- Pettersson, M., Ahren, B., Lundquist, I., Böttcher, G., Sundler, F.** Neuropeptide Y: intrapancreatic neuronal localization and effects on insulin secretion in the mouse. *Cell Tissue Res*, (1987), 248:43-48.
- Pettersson, M., Ahren, B.** Insulin secretion in rats: effects of neuropeptide Y and noradrenaline. *Diabetes Res*, (1990), 13:35-42.
- Pierce, J., Parsons, T.F.** Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem*, (1981), 50:465-495.
- Piper Duckles, S., Buxton, I.L.O.** Neuropeptide Y potentiates norepinephrine-stimulated inositol phosphate production in rat tail artery. *Life Sci*, (1994), 55:103-109.
- Plummer, M.R., Logothetis, D.E., Hess, P.** Elementary properties and pharmacological sensitivities of calcium channels in mammalian peripheral neurons. *Neuron*, (1989), 2:1453-1463.

- Potier, B., Rovira, C.** Protein tyrosine kinase inhibitors reduce high-voltage activating calcium currents in CA1 pyramidal neurones from rat hippocampal slices. *Brain Res*, (1999), 816:587-597.
- Porthé, G., Valette, A., Moisand, A., Tafani, M., Cros, J.** Localization of human placental opiate binding sites on the syncytial brush border membrane. *Life Sci*, (1982), 31:2647-2654.
- Pozzan, T., Rizzuto, R., Volpe, P., Meldolesi, J.** Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Rev*, (1994), 74:595-636.
- Prpic, V., Basavappa, S., Liddle, R.A., Mangel, A.W.** Regulation of cholecystokinin secretion by calcium-dependent calmodulin kinase II: differential effects of phenylalanine and cAMP. *Biochem Biophys Res Commun*, (1994), 201:1483-1489.
- Ptasznik, A., Traynor-Kaplan, A., Bokoch, G.M.** G protein coupled chemoattractant receptors regulate Lyn tyrosine kinase · Shc adapter protein signaling complexes. *J Biol Chem*, (1995), 270:19969-19973.
- Püschel, G., Mentlein, R., Heymann, E.** Isolation and characterization of dipeptidyl peptidase IV from human placenta. *Eur J Biochem*, (1982), 126:359-365.
- Putney, J.W.** A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell calcium*, (1986), 7:1-12.
- Putney, J.W.** Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium*, (1990), 11:611-624.
- Putney, J.W., Bird, G.S.J.** The inositol phosphate-calcium signaling system in nonexcitable cells. *Endocr Rev*, (1993), 14:610-631.

- Quartero, H.W.P., Fry, C.H.** Placental corticotropin-releasing factor may modulate human parturition. *Placenta*, (1989),10:439-443.
- Quartero, H.W.P., Noort W.A., Fry, C.H., Keirse, J.N.C.** Role of prostaglandins and leukotrienes in the synergistic effect of oxytocin and corticotropin-releasing hormone (CRH) on the contraction force in human gestational myometrium. *Prostaglandins*, (1991), 42:137-150.
- Quartero, H.W.P., Srivasta, G., Gillham, B.** Role of cyclic adenosine monophosphate in the synergistic interaction between oxytocin and corticotrophin-releasing factor in isolated human gestational myometrium. *Clin Endocrinol*, (1992), 36:141-145.
- Raisanen, I.** Plasma levels and diurnal variation of beta-endorphin, beta lipotropin and corticotropin during pregnancy and early puerperium. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, (1988), 27:13-20.
- Randriamampita, C., Tsien, R.Y.** Emptying of intracellular Ca^{2+} stores release a novel small messenger that stimulates Ca^{2+} influx. *Nature*, (1993), 364:809-814.
- Raymond, J.R.** Multiple mechanisms of receptor-G protein signaling specificity. *Am J Physiol*, (1995), 269:F141-F158.
- Regnouf, F., Sagot, I., Delouche, B., Devilliers, G., Cartaud, J., Henry, J.P., Pradel, L.A.** "In vitro" phosphorylation of annexin 2 heterotetramer by protein kinase C. Comparative properties of the unphosphorylated and phosphorylated annexin 2 on the aggregation and fusion of chromaffin granule membranes. *J Biol Chem*, (1995), 270:27143-27150.

- Reinecke, M., Forssmann, W.G.** Neuropeptide (neuropeptide Y, neurotensin, vasoactive intestinal polypeptide, substance P, calcitonine gene-related peptide, somatostatin) immunohistochemistry and ultrastructure of renal nerves. *Histochemistry*, (1988), 89:1-9.
- Reyes, F.I., Boroditsky, R.S., Winter, J.S.D., Faiman, C.** Studies on human sexual development. II. Fetal and maternal serum gonadotropin and sex steroid concentrations. *J Clin Endocrinol Metab*, (1974), 38:612-617.
- Rhee, S.G., Choi, K.D.** Regulation of inositol specific phospholipase C isozymes. *J Biol Chem*, (1992), 267:12393-12396.
- Riley, S.C., Challis, J.R.G.** Corticotropin-releasing hormone production by the placenta and fetal membranes. *Placenta*, (1991), 12:105-119.
- Riley, S.C., Walton, J.C., Herlick, J.M., Challis, J.R.G.** The localization and distribution of corticotropin-releasing hormone in the human placenta and fetal membranes throughout gestation. *J Clin Endocrinol Metab*, (1991), 72:1001-1007.
- Rivera, J., Beaven, M.A.** Regulation of secretion from secretory cells by protein kinase C. In: Parker, P.J., Dekker, L.V. (eds), Protein kinase C. (1997), pp 133-166
- Robinson, B., Emanuel, R., Frim, D., Majzoub, J.** Glucocorticoid stimulates expression of corticotropin-releasing hormone gene in human placenta. *Proc Natl Acad Sci USA*, (1988) 85:5244-5248.
- Robinson, J., Chidzanja, S., Kind, K., Lok, F., Owens, P., Owens, J.** Placental control of fetal growth. *Reprod Fertil Dev*, (1995), 7:333-344.

- Rodger, I.W.** Chapter 7 : Voltage-dependent and receptor-operated calcium channels. In : Raeburn, D., Giembycz, M.A. (eds), Airways Smooth muscle : peptide receptors, ion channels and signal transduction. pp 156-167.
- Roe, C.M., Leich, I.M., Boura, A.I., Smith, R.** Nitric oxide-regulation of corticotropin-releasing hormone release from human perfused placenta *in vitro*. *J Clin Endocrinol Metab*, (1996), 81 :763-769.
- Romier, C., Bernassau, J.M., Cambillau, C., Darbon, H.** Solution structure of human corticotropin releasing factor by 1H NMR and distance geometry with restrained molecular dynamics. *Protein Eng*, (1993), 6:149-156.
- Rose, P.M., Fernandes, P., Lynch, J.S., Frazier, S.T., Fisher, S.M., Kodukula, K., Kienzle, B., Seethala, R.** Cloning and expression of a cDNA encoding a human type 2 neuropeptide Y receptor. *J Biol Chem*, (1995), 270: 22661-22664.
- Rose, P.M., Lynch, J.S., Frazier, S.T., Fisher, S.M., Chung, W., Battaglino, Fathi, Z., Leibel, R., Fernandes, P.** Molecular genetic analysis of a human neuropeptide Y receptor: the human homolog of the murine "Y5" receptor may be a pseudogene. *J Biol Chem*, (1997), 272:3622-3627.
- Rudolf, K., Eberlein, W., Engel, W., Wieland, H.A., Willim, K.D., Entzeroth, M., Wienen, W., Beck-Sickinger, A.G., Doods, H.N.** The first highly potent and selective non-peptide neuropeptide Y Y₁ receptor antagonist: BIBP3226. *Eur J Pharmacol*, (1994) 271:R11-R13.
- Saffran, M., Schally, A.V.** The status of the corticotropin releasing factor (CRF). *Neuroendocrinology*, (1977), 24:359-375.

- Saijonma, O., Laatikainen, T., Wahlstrom, T.** Corticotropin-releasing factor in human placenta: localization, concentration and release *in vitro*. *Placenta*, (1988), 9:373-385.
- Samama, P., Cotecchia, S., Costa, T., Lefckowitz, R.J.** A mutation-induced activated state of the α_2 -adrenergic receptor. *J Biol Chem*, (1993), 268:4625-4636.
- Sanstedt, B.** The placenta and low birth weight. *Curr Top Pathol*, (1979), 66:1-55.
- Sapolsky, R., Rivier, C., Yamamoto, G., Plotsky, P., Vale, W.** Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic Corticotropin-releasing factor. *Science*, (1987), 238:522-524.
- Sargent, I.L.** Maternal and fetal immune responses during pregnancy. *Exp Clin Immunogenet*, (1993);10:85-102.
- Sasaki, A., Liotta, A.S., Lukey, M.M., Margioris, A.N., Suda, T., Krieger, D.T.** Immunoreactive corticotropin-releasing factor is present in human maternal plasma during the third trimester of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*, (1984), 59:812-817.
- Sasaki, A., Sato, S., Murakami, O., Go, M., Inoue, M., Shimizu, Y., Hanew, K., Andoh, N., Sato, I., Sasano, N., Yoshinaga, K.** Immunoreactive corticotropin-releasing hormone present in human plasma may be derived from both hypothalamic and extrahypothalamic sources. *J Clin Endocrinol Metab*, (1987a), 65:176-182.
- Sasaki, A., Shinkawa, O., Margioris, A.N., Liotta, A.S., Sato, S., Murakami, O., Go, M., Shimizu, Y., Hanew, K., Yoshinaga, K.** Immunoreactive corticotropin-releasing hormone in human plasma during pregnancy, labor, and delivery. *J Clin Endocrinol Metab*, (1987b), 64:224-229.

- Sasaki, A., Shinkawa, O., Yoshinaga, K.** Placental corticotropin-releasing hormone may be a stimulator of maternal pituitary adrenocorticotrophic hormone secretion in humans. *J Clin Invest*, (1989), 84:1997-2001.
- Sastry, B.V.** Human placental cholinergic system. *Biochem Pharmacol*, (1997), 53:1577-1586.
- Sautel, M., Martinez, R., Munoz, M., Peitsch, M.C., Beck-Sickinger, A.G., Walker, P.** Role of a hydrophobic pocket of the human Y1 neuropeptide Y receptor in ligand binding. *Mol Cell Endocrinol*, (1995), 112:215-222.
- Sautel, M., Rudolf, K., Wittneben, H., Herzog, H., Martinez, R., Munoz, M., Eberlein, W., Engel, W., Walker, P., Beck-Sickinger, A.G.** Neuropeptide Y and the nonpeptide antagonist BIBP 3226 share an overlapping binding site at the human Y₁ receptor. *Mol Pharmacol*, (1996), 50:285-292.
- Sawchenko, P.E., Imaki, T., Potter, E., Kovacs, K., Imaki, J., Vale, W.** The functional neuroanatomy of corticotropin-releasing factor. *Ciba Found Symp*, (1993) 172:5-21.
- Schillace, R.V., Scott, J.D.** Organization of kinases, phosphatases, and receptor signaling complexes. *J Clin Invest*, (1999), 103:761-765.
- Schneider, H.** The role of the placenta in nutrition of the human fetus. *Am J Obstet Gynecol*, (1991), 164:967-973.
- Schober, D.A., Van Abbema, A.M., Smiley, D.L., Bruns, R.F., Gehlert, D.R.** The neuropeptide Y Y1 antagonist, 1229U91, a potent agonist for the human pancreatic polypeptide-preferring (NPY Y4) receptor. *Peptides*, (1998), 19:537-542.

- Schulte, H.M., Weisner, D., Allolio, B.** The corticotrophin releasing hormone test in late pregnancy: lack of adrenocorticotrophin and cortisol response. *Clin Endocrinol*, (1990), 33:99-106.
- Schuhmann, K., Groschner, K.** Protein kinase-C mediates dual modulation of L-type Ca^{2+} channels in human vascular smooth muscle. *FEBS Lett*, (1994), 341:208-212.
- Schweitzer, E.S., Sanderson, M.J., Wasterlain, C.G.** Inhibition of regulated catecholamine secretion from PC12 cells by the Ca^{2+} /calmodulin kinase II inhibitor KN-62. *J Cell Sci*, (1995), 108:2619-2628.
- Seasholtz, A.F., Thompson, R.C., Douglas, J.O.** Identification of a cyclic adenosine monophosphate-responsive element in the rat corticotropin-releasing hormone gene. *Mol Endocrinol*, (1988), 2:1311-1319.
- Selbie, L.A., Darby, K., Schmitz-Peiffer, C., Browne, C.L., Herzog, H., Shine, J., Biden, T.J.** Synergistic interaction of Y1-neuropeptide Y and alpha 1b-adrenergic receptors in the regulation of phospholipase C, protein kinase C, and arachidonic acid production. *J Biol Chem*, (1995), 270:11789-11796.
- Sen, D.K., Kaufmann, P., Schweikhart, G.** Classification of human placental villi. II. Morphometry. *Cell Tissue Res*, (1979), 200:425-434.
- Serradeil-Le Gal, C., Valette, G., Rouby, P.-E., Pellet, A., Oury-Donat, F., Brossard, G., Lespy, L., Marty, E., Neliat, G., de Cointet, P., Maffrand, J.-P., Le Fur, G.** SR120819A, an orally-active and selective neuropeptide Y Y1 receptor antagonist. *FEBS Lett*, (1995), 362:192-196.

- Servin, A.L., Rouyer-Fessard, C., Balasubramaniam, A., Saint Pierre, S., Laburthe, M.** Peptide-YY and neuropeptide-Y inhibit vasoactive intestinal peptide-stimulated adenosine 3',5'-monophosphate production in rat small intestine: structural requirements of peptides for interacting with peptide-YY-preferring receptors. *Endocrinology*, (1989), 124:692-700.
- Shao, X., Davletov, B.A., Sutton, R.B., Sudhof, T.C., Rizo, J.** Bipartite Ca²⁺-binding motif in C2 domains of synaptotagmin and protein kinase C. *Science*, (1996), 273:248-251.
- Sharma, P., Holmberg, S.K., Eriksson, H., Beck-Sickinger, A.G., Grundemar, L., Larhammar, D.** Cloning and functional expression of the guinea pig neuropeptide Y Y2 receptor. *Regul Pept*, (1998), 75-76:23-28
- Shaw, C., Cormican, K., Thim, L., Maule, A.G., Sloan, J.M., Buchanan, K.D.** Neuropeptide Y and neuropeptide Y 3-36: isolation from human pancreatic endocrine tumours, *Regul Pept*, (1993), 45:387-394.
- Shaw, G.** The pleckstrin homology domain: an intriguing multifunctional protein module. *Bioessays*. (1996), 18:35-46.
- Sheriff, S., Chance, W., Fischer, J., Balasubramaniam, A.** Neuropeptide Y treatment and food deprivation increase cyclic AMP response element-binding in rat hypothalamus. *Mol Pharmacol*, (1997), 51:597-604.

- Sheriff, S., Dayal, R., Kasckow, J., Regmi, A., Chance, W., Fischer, J., Balasubramaniam, A.** NPY upregulates genes containing cyclic AMP response element in human neuroblastoma cell lines bearing Y1 and Y2 receptors: involvement of CREB. *Regul Pept*, (1998), 75-76:309-318.
- Sheth, K.V., Roca, G.L., Al-Sedairy, S., Parhar, R., Hamilton, G., Al-Abdul Jabbar, F.** Prediction of successful embryo implantation by measuring interleukin-1-alpha and immunosuppressive factor(s) in preimplantation. *Fertil Steril*, (1991), 55:952-957.
- Shi, C.Z., Zhuang, L.Z.** Norepinephrine regulates human chorionic gonadotrophin production by first trimester trophoblast tissue *in vitro*. *Placenta*, (1993), 14:683-693.
- Shi, Q.J., Lei, Z.M., Rao, C.V., Lin, J.** Novel role of human chorionic gonadotropin in differentiation of human cytotrophoblasts. *Endocrinology*, (1993), 132:1387-1395.
- Shibahara, S., Morimoto, Y., Furutani, Y., Notake, M., Takahashi, H., Shimizu, S., Horikawa, S., Numa, S.** Isolation and sequence analysis of the human corticotropin-releasing factor precursor gene. *EMBO J*, (1983), 2:775-779.
- Shibasaki, T., Odagiri, E., Shizume, K., Ling, N.** Corticotropin-releasing factor-like activity in human placental extract. *J Clin Endocrinol Metab*, (1982), 55:384-386.
- Shigeri, Y., Fujimoto, M.** Two different signal transductions of neuropeptide Y1 receptor in SK-N-MC cells. *Biochem Biophys Res Commun*, (1992), 187:1565-1571.
- Shigeri, Y., Nakajima, S., Fujimoto, M.** Neuropeptide YY1 receptors-mediated increase in intracellular Ca²⁺ concentration via phospholipase C-dependent pathway in porcine aortic smooth muscle cells. *J Biochem*, (1995), 118:515-520.

- Shimazaki, Y., Nishiki, T., Omori, A., Sekiguchi, M., Kamata, Y., Kozaki, S., Takahashi, M.** Phosphorylation of 25-kDa synaptosome-associated protein. Possible involvement in protein kinase C-mediated regulation of neurotransmitter release. *J Biol Chem*, (1996), 271:14548-14553.
- Shuttleworth, T.J.** Intracellular Ca^{2+} signalling in secretory cells. *J Exp Biol*, (1997), 200:303-314.
- Shuttleworth, T.J., Thompson, J.L.** Muscarinic receptor activation of arachidonate-mediated Ca^{2+} entry in HEK293 cells is independent of phospholipase C. *J Biol Chem*, (1998), 273:32636-32643.
- Simon, M.I., Strathmann, M.P., Gautam, N.** Diversity of G proteins in signal transduction. *Science*, (1991), 252:802-808.
- Simon, C., Frances, A., Piquette, G., Danasouri, I., Zurawski, G., Dang, W., Polan, M.** Embryonic implantation in mice is blocked by interleukin-1 receptor antagonist. *Endocrinology*, (1992), 134:521-529.
- Singh, G., Singh L., Kaufman, J-P.** Y_2 receptors for the peptide YY and neuropeptide Y on dispersed chief cells from guinea pig stomach. *Am J Physiol*, (1992), 262:G756-G762.
- Sinkins, W.G., Estacion, M., Schilling, W.P.** Functional expression of TrpC1: a human homologue of the *Drosophila* Trp channel. *Biochem J*, (1998), 331:331-339.
- Sladek, S.M., Westerhausen-Larson, A., Roberts, J.M.** Endogenous nitric oxide suppresses rat myometrial connexin 43 gap junction protein expression during pregnancy. *Biol Reprod*, (1999), 61:8-13.

- Slominski, A., Ermak, G., Hwang, J., Chakraborty, A., Mazurkiewicz, J.E., Mihm, M.** Proopiomelanocortin, corticotropin releasing hormone and corticotropin releasing hormone receptor genes are expressed in human skin. *FEBS Lett*, (1995), 374:113-116.
- Smith, C.H., Nelson, D.M., King, B.F., Donohue, T.M., Ruzycski, S., Kelley, L.K.** Characterization of a microvillous membrane preparation from human placental syncytiotrophoblast: a morphologic, biochemical, and physiologic, study. *Am J Obstet Gynecol*, (1977), 128:190-196.
- Smith, R.** Alterations in the hypothalamic pituitary adrenal axis during pregnancy and the placental clock that determines the length of parturition. *J Reprod Immunol*, (1998), 215-220.
- Smith, R., Cubis, J., Brinsmead, M., Lewin, T., Singh, B., Owens, Chan, E.C., Hall, C., Adler, M., Lovelock, M., Hurt, D., Rowley, M., Nolan, M.** Mood changes, obstetric experience, and alterations in plasma cortisol, β -endorphin and corticotrophin releasing hormone during pregnancy and puerperium. *J Psychosom Res*, (1998a), 34:53-69.
- Smith, R., Mesiano, S., Chan, E.C., Brown, S., Jaffe, R.B.** Corticotropin-releasing hormone directly and preferentially stimulates dehydroepiandrosterone sulfate secretion by human fetal adrenal cortical cells. *J Clin Endocrinol Metab*, (1998b), 83:2916-2920.
- Smrcka, A.V., Stenrweis, P.C.** Regulation of purified subtypes of phosphatidylinositol-specific phospholipase C β by G protein α and $\beta\gamma$ subunits. *J Biol Chem*, (1993), 268:9667-9674.
- Soares Lemos, V., Takeda, K.** Neuropeptide Y_2 -type recepto-mediated activation of large-conductance Ca^{2+} -sensitive K^+ channels in human neuroblastoma cell line. *Pflügers Arch – Eur J Physiol*, (1995), 430:534-540.

- Sossin, W.S., Schwartz, J.H.** Calcium-independent protein kinase Cs contain an amino-terminal domain similar to the C2 consensus sequence. *Trends Biochem sci*, (1993), 18:207-208.
- Spengler, D., Weaber, C., Pantaloni, C., Holsboer, F., Bockaert, J., Seeburg, P.H., Journot, L.** differential, signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature*, (1993), 365:170-175.
- Spiegel, A.M.** Signal transduction by guanine nucleotide binding proteins. *Mol Cell Endocrinol*, (1987), 49:1-16.
- Spiess, J., Rivier, J., Rivier, C., Vale, W.** Primary structure of corticotropin-releasing factor from ovine hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci USA*, (1981), 78:6517-6521.
- Stanley, B.G., Daniel, D.R., Chin, A.S., Leibowitz, S.F.** Paraventricular nucleus injections of peptide YY and neuropeptide Y preferentially enhance carbohydrate ingestion. *Peptides*, (1985), 6:1205-1211.
- Stanley, B.G., Magdalin, W., Seirafi, A., Nguyen, M.M., Leibowitz, J.F.** Evidence for neuropeptide Y mediation of eating produced by food deprivation and for a variant of the Y1 receptor mediating this peptide's effect. *Peptides*, (1992), 13581-587.
- Starbäck, P., Lundell, I., Fredriksson, R., Berglund, M.M., Yan, Y-L., Wraith, A., Söderberg, C., Postlethwait, J.H., Larhammar, D.** Neuropeptide Y receptor subtype with unique properties cloned in the zebrafish: the zYa receptor. *Mol Brain Res*, (1999), 70:242-252.
- Starck, S., Barban, M.A., Wadzinski, B.E., Colbran, R.J.** Differential inactivation of postsynaptic density-associated and soluble Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II by protein phosphatase 1 and 2a. *J Neurochem*, (1997), 68:2119-2128.

- Stenzel, P., Kesterson, R., Yeung, W., Cone, R.D., Rittenberg, M.B., Stenzel-Poore, M.P.** Identification of a novel murine receptor for corticotropin-releasing hormone expressed in the heart. *Mol Endocrinol*, (1995), 9:637-645.
- Stephens, L., Smrcka, A., Cooke, F.T., Jackson, T.R., Sternweis, P.C., Hawkins, P.T.** A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein beta gamma subunits. *Cell*, (1994), 77:83-93.
- Stephens, L.R., Eguinoa, A., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Cooke, F., Coadwell, J., Smrcka, A.S., Thelen, M., Cadwallader, K., Tempst, P., Hawkins, P.T.** The G $\beta\gamma$ sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. *Cell*, (1997), 89:105-114.
- Stjernquist, M., Ekblad, E., Nordstedt, E., Radzuweit, C.** Neuropeptide Y (NPY) co-exist with tyrosine hydroxylase and potentiates the adrenergic contractile response of vascular smooth muscle in the human uterine artery. *Hum Reprod*, (1991), 6:1034-1038.
- Stojilkovic, S.S., Iida, T., Merelli, F., Torsello, F., Ktrsmannovic, L.Z., Catt, K.J.** Interactions between calcium and protein kinase C in the control of signaling and secretion in pituitary gonadotrophs. *J Biol Chem*. (1991), 266:10377-10384.
- St-Denis, A., Chano, F., Tremblay, P., St-Pierre, Y., Descoteaux, A.** Protein kinase C- α modulates lipopolysaccharide-induced functions in a murine macrophage cell line. *J Biol Chem*, (1998), 273:32787-32792.
- Stumpo, D.J., Graff, J.M., Albert, K.A., Greengard, P., Blackshear, P.J.** Molecular cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding the "80- to 87-kDa" myristoylated alanine-rich C kinase substrate: a major cellular substrate for protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA*, (1989), 86:4012-4016.

- Stoyanov, B., Volinia, S., Hanck, T., Rubio, I., Loubtchenkov, M., Malek, D., Stoyanova, S., Vanhaesebroeck, B., Dhand, R., Nürnberg, B., Gierschik, P., Seedorf, K., Hsuan, J.J., Waterfield, M.D., Wetsker, R.** Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. *Science*, (1995), 269:690-693.
- Strader, C.D., Fong, T.M., Tota, M.R.** Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Biochem*, (1994), 63:101-132.
- Strickland, S., Richards, W.G.** Invasion of the trophoblasts. *Cell*, (1992), 71:355-357.
- Strott, C.A., Yoshimi, T., Ross, G.T., Lipsett, M.B.** Ovarian physiology: relationship between plasma LH and steroidogenesis by the follicle and *corpus luteum*: effect of hCG. *J Clin Endocrinol Metab*, (1969), 29:1157-1167.
- Suda, T., Tomori, N., Tozawa, F., Mouri, T., Demura, H., Shizume, K.** Distribution and characterization of immunoreactive corticotropin-releasing factor in human tissues. *J Clin Endocrinol Metab*, (1984) 59:861-866.
- Suda, T., Tomori, N., Yajima, F., Sumitomo, T., Nakagami, Y., Ushiyama, T., Demura, H., Shizume, K.** Immunoreactive corticotropin-releasing factor in human plasma. *J Clin Invest*, (1985a) 76:2026-2029.
- Suda, T., Yajima, F., Tomori, N., Demura, H., Shizume, K.** *In vitro* study of immunoreactive corticotropin-releasing factor release from the rat hypothalamus. *Life Sci*, (1985b), 37:1499-1505.
- Suda, T., Iwashita, M., Tozawa, F., Ushiyama, T., Tomori, N., Sumitomo, T., Nakagami, Y., Demura, H., Shizume, K.** Characterization of corticotropin-releasing hormone binding protein binding protein in human plasma by chemical cross-linking and its binding during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*, (1988), 67:1278-1283.

- Suda, T., Iwashita, Ushiyama, T., M., Tozawa, F., Sumitomo, T., Nakagami, Y., Demura, H., Shizume, K.** Responses to corticotropin releasing hormone and its bound and free forms in pregnant and nonpregnant women. *J Clin Endocrinol Metab*, (1989), 69:38-42.
- Suda, T., Tozawa, F., Iwai, I., Sato, Y., Sumitomo, T., Nakano, Y., Yamada, M., Demura, H.** Neuropeptide Y increases the corticotropin-releasing factor messenger ribonucleic acid level in the rat hypothalamus. *Brain Res Mol Brain Res*, (1993), 18:311-315.
- Sun, H., Charles, C.H., Lau, L.F., Tonks, N.K.** MKP-1 (3CH1-34), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. *Cell*, (1993), 75:487-493.
- Sun, K., Smith, R., Robinson, P.J.** Basal and KCl-stimulated corticotropin-releasing hormone release from placental syncytiotrophoblasts is inhibited by sodium nitroprusside. *J Clin Endocrinol Metab*, (1994), 79:519-524.
- Sun, L., Philipson, L.H., Miller, R.J.** Regulation of K^+ and Ca^{2+} channels by a family of Neuropeptide Y receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, (1998), 284:625-632.
- Sutton, R.B., Sprang, S.R.** Structure of the protein kinase Cbeta phospholipid-binding C2 domain complexed with Ca^{2+} . *Structure*, (1998), 6:1395-1405.
- Swahn, M.L., Bygdeman, M.** The effect of the antiprogestin RU 486 on uterine contractility and sensitivity to prostaglandin and oxytocin. *Br J Obstet Gynaecol*, (1988), 95:126-134.
- Tabibzadeh, S.** Molecular control of the implantation window. *Hum Reprod Update*, (1998), 4:465-471.

- Tang, J.X., Janmey, P.A.** The polyelectrolyte nature of F-actin and the mechanism of actin bundle formation. *J Biol Chem*, (1996), 271:8556-8563.
- Tatemoto, K.** Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide. *Proc Natl Acad Sci USA*, (1982), 79:5485-5489.
- Tatemoto, K., Carlquist, M., Mutt, V.** Neuropeptide Y: a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature*, (1982), 296:659-660.
- Tedde, G., Tedde-Piras, A.** Mitotic index of the Langhans' cells in the normal human placenta from the early stages of pregnancy to the term. *Acta Anat*, (1978), 100:114-119.
- Tepikin, A., Voronina, S.G., Gallacher, D.V., Petersen, O.H.** Acetylcholine-evoked increase in cytoplasmic Ca^{2+} concentration and Ca^{2+} extrusion measured simultaneously in single mouse pancreatic acinar cells, *J Biol Chem*, (1992), 267:3569-3572.
- Terzakis, J.A.** The ultrastructure of normal human first trimester placenta. *J Ultrastruct Res*, (1963), 9:268-284.
- Teysse, S., Grandt, D., Niebergall-Roth, E., Schimiczek, M., Goebell, H., Eysselein, V.E., Reeve, J.R.jr, Singer, M.V.** Inhibition of canine exocrine pancreatic secretion by peptide YY is mediated by PYY-preferring Y2 receptors. *Pancreas*, (1996), 13:80-88.
- Tezuka, N., Ali, M., Chwalisz, K., Garfield, R.E.** Changes in transcripts encoding calcium channel subunits of rat myometrium during pregnancy. *Am J Physiol*, (1995), 269:C1008-C1017.

- Thiel, G., Czernik, A.J., Gorelick, F., Nairn, A.C. Greengard, P.** Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II: identification of the thr-286 as the autophosphorylation site in the α -subunit associated with the generation of Ca^{2+} -independent activity. *Proc Natl Acad Sci*, (1988), 85:6337-6341.
- Thomas, D., Henley, M.R.** Evaluation of calcium influx factors from stimulated jurkat T-lymphocytes by microinjection into *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem*, (1995), 270:6429-6432.
- Thomas, A.P., Bird, G.S.J., Hajnóczky, G., Robb-Gaspers, L.D., Putney J.W.** Spatial and temporal aspect of cellular calcium signaling. *FASEB J*, (1996), 10:1505-1517.
- Thompson, R.C., Seasholtz, A.F., Herbert, E.** Rat corticotropin-releasing hormone gene: sequence and tissue-specific expression. *Mol Endocrinol*, (1987), 1:363-370.
- Thomson, M., Chan, E.C., Falconer, J., Madsen, G., Smith, R.** Secretion of corticotropin-releasing hormone by superfused human placental fragments. *Gynecol Endocrinol*, (1988), 2:87-100.
- Thorn, P., Lawrie, A.M. Smith, P.M., Gallacher, D.V., Petersen, O.H.** Ca^{2+} oscillations in pancreatic acinar cells: spatiotemporal relationships and functional implications. *Cell Calcium*, (1993), 14:746-757.
- Thornton, S., Davison, J.M., Baylis, P.H.** plasma oxytocin during the first and second stages of spontaneous labour. *Acta Endocrinol*, (1992), 126:425-429.

- Toker, A., Meyer, M., Reddy, K.K., Falck, J.R., Aneja, R., Aneja, S., Parra, A., Burns, D.J., Ballas, L.M., Cantley, L.C.** Activation of protein kinase C family members by the novel polyphosphoinositides PtdIns-3,4-P2 and PtdIns-3,4,5-P3. *J Biol Chem*, (1994), 269:32358-32367.
- Tropper, P.J., Warren, W.B., Jozak, S.M., Conwell, I.M., Stark, R.L., Goland, R.S.** Corticotropin releasing hormone concentrations in umbilical cord blood of preterm fetuses. *J Dev Physiol*, (1992), 18:81-85.
- Tsagarakis, S., Holly, J.M.P., G., Rees, L.H., Besser, G.M., Grossman, A.** Acetylcholine and norepinephrine stimulate the release of corticotropin-releasing factor-41 from the rat hypothalamus *in vitro*. *Endocrinology*, (1988), 123:1962-1969.
- Tsagarakis, S., Gillies, G., Rees, L.H., Besser, G.M., Grossman, A.** Interleukin-1 directly stimulates the release of corticotropin-releasing factor from rat hypothalamus. *Neuroendocrinology*, (1989a), 49:98-101.
- Tsagarakis, S., Rees, L.H., Besser, G.M., Grossman, A.** Neuropeptide-Y stimulates CRF-41 release from rat hypothalamus *in vitro*. *Brain Res*, (1989b), 502:167-170.
- Tsagarakis, S., Rees, L.H., Besser, G.M., Grossman, A.** Involvement of calmodulin in depolarization-induced release of corticotropin-releasing hormone-41 from rat hypothalamus *in vitro*. *J Mol Endocrinol*, (1991), 7:71-75.
- Tsien, R.Y.** New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry*, (1980), 19:2396-2404.

- Tulchinsky, D., Hobel, C.J., Yeager, E., Marshall, J.R.** Plasma estrone, estradiol, progesterone, and 17-hydroxyprogesterone in human pregnancy. I. normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, (1972), 112:1095-1100.
- Überall, F., Giselbrecht, S., Hellbert, K., Fresser, F., Bauer, B., Gschwendt, M., Grunicke, H.H., Baier, G.** Conventional PKC-alpha, novel PKC-epsilon and PKC-theta, but not atypical PKC-lambda are MARCKS kinases in intact NIH 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem*, (1997), 272:4072-4078.
- Unnikumar, K.R., Wegmann, R., Panigel, M.** Immunohistochemical profile of the human placenta: studies on localization of prolactin, human chorionic gonadotropin, human placental lactogen, renin and oxytocin. *Cell Mol Biol*, (1988), 34:697-710.
- Ushio-Fukai, M., Griendling, K.K., Akers, M., Lyons, P.R., Alexander, R.W.** Temporal dispersion of activation of phospholipase C-beta1 and -gamma isoforms by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Role of alphaq/11, alpha12, and beta gamma G protein subunits. *J Biol Chem*, (1998), 273:19772-19777.
- Usui, T., Nakai, Y., Tsukada, T., Jingami, H., Takahashi, H., Fukata, J., Imura, H.** Expression of adrenocorticotropin-releasing hormone precursor gene in placenta and other nonhypothalamic tissues in man. *Mol Endocrinol*, (1988), 2:871-875.
- Vale, W., Spiess, J., Rivier, J.** Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and β -endorphin. *Science*, (1981), 213:1394-1397.
- Van, L.V.** Phorbol ester stimulates the activity of human corticotropin-releasing hormone gene promoter via 3',5'-cyclic adenosine monophosphate response element in transiently transfected chicken macrophage. *Endocrinology*, (1993), 132:30-34.

- van Biesen, T., Hawes, B.E., Luttrell, D.K., Krueger, K.M., Touhara, K., Porfiri, E., Sakaue, M., Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J.** Receptor-tyrosine-kinase- and G $\beta\gamma$ -mediated MAP kinase activation by a common signalling pathway. *Nature*, (1995), 781-784.
- van Biesen, T., Hawes, B.E., Raymond, J.R., Luttrell, L.M., Koch, W.J., Lefkowitz, R.J.** G(o)-protein alpha-subunits activate mitogen-activated protein kinase via a novel protein kinase C-dependent mechanism. *J Biol Chem*, (1996), 271:1266-1269.
- van Corven, E.J., Hordijk, P.L., Medema, R.H., Bos, J.L., Moolenaar, W.H.** Pertussis toxin-sensitive activation of p21^{ras} by G protein-coupled receptor agonist in fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, (1993), 90:1257-1261.
- Varadi, G., Mori, Y., Mikala, G., Schwartz, A.** Molecular determinant of Ca²⁺ channel function and drug action. *Trends Pharmacol Sci*, (1995), 16:43-49.
- Vaughan, J., Donaldson, C., Bittencourt, J., Perrin, M.H., Lewis, K., Sutton, S., Chan, R., Turnbull, A.V., Lovejoy, D., Rivier, C., Sawchenko, P.E., Vale, W.** Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature*, (1995), 378:287-292.
- Viard, P., Exner, T., Maier, U., Mironneau, J., Nurnberg, B., Macrez, N.** $\beta\gamma$ dimers stimulate vascular L-type Ca²⁺ channels via phosphoinositide 3-kinase. *FASEB J*, (1999), 13:685-694.
- Vita, N., Laurent, P., Lefort, S., Chalon, P., Lelias, J.M., Kaghad, M., Le Fur, G., Caput, D., Ferrara, P.** Primary structure and functional expression of mouse pituitary and human brain corticotrophin releasing factor receptors. *FEBS Lett*, (1993), 335:1-5.

- Voisin, T., Couvineau, A., Rouyer-Fessard, C., Laburthe, M.** Solubilization and hydrodynamic properties of active peptide YY receptor from rat jejunal crypts. Characterization as a Mr 44,000 glycoprotein. *J Biol Chem*, (1991), 266:10762-10767.
- Voisin, T., Bens, M., Cluzeaud, F., Vandewalle, A., Laburthe, M.** Peptide YY receptors in the proximal tubule PKSV-PCT cell line derived from transgenic mice. *J Biol Chem*, (1993), 268:20547-20554.
- Voutilainen, R., Miller, W.L.** Development expression of genes for the steroidogenic enzymes P450scc(20,22-Desmolase), P450c17 (17 α -hydroxylase/17,20-Lyase), and P450c21 (21-hydroxylase) in the human fetus. *J Clin Endocrinol Metab*, (1986), 63:1145-1150.
- Waddell, B.J.** The placenta as hypothalamus and pituitary: possible impact on maternal and fetal adrenal function. *Reprod Fertil Dev*, (1993), 5:479-497.
- Wadhwa, P.D., Sandman, C.A., Chicz-DeMet, A., Porto, M.** Placental CRH modulates maternal pituitary-adrenal function in human pregnancy. *Ann NY Acad Sci*, (1997), 814:276-281.
- Wahlestedt, C., Yanaihara, N., Håkanson, R.** Evidence for different pre- and post-junctional receptors for neuropeptide Y and related peptides. *Regul Pept*, (1986), 13:307-318.
- Wahlestedt, C., Skagerberg, G., Ekman, R., Heilig, M., Sundler, F., Håkanson, R.** Neuropeptide Y (NPY) in the area of the hypothalamic paraventricular nucleus activates the pituitary-adrenocortical axis in the rat. *Brain Res*, (1987), 417:33-38.
- Wahlestedt, C., Pick, E., Koob, G.F., Yee, F., Heilig, M.** Modulation of anxiety and neuropeptide Y-Y₁ receptors by antisense oligonucleotides. *Science*, (1992a), 528-531.

- Wahlestedt, C., Regunathan, S., Reis, D.J.** Identification of cultured cells selectively expressing Y1-, Y2-, or Y3-type receptors for neuropeptide Y/peptide YY. *Life Sci*, (1992b), 50:PL7-PL12.
- Walaas, S.I.** Regulation of calcium-dependent [³H]noradrenaline release from rat cerebrocortical synaptosomes by protein kinase C and modulation of the actin cytoskeleton. *Neurochem Int*, (1999), 34:221-233.
- Walker, P., Monoz, M., Martinez, R., Peitsch, M.C.** Acidic residues in extracellular loops of the human Y1 neuropeptide Y receptor are essential for ligand binding. *J Biol Chem*, (1994), 269:2863-2869.
- Wan, Y., Kurosaki, T., Huang, X.Y.** Tyrosine kinases in activation of the MAP kinase cascade by G protein-coupled receptors. *Nature*, (1996), 380:541-544.
- Wan, Y., Bence, K., Hata, A., Kurosaki, T., Veillette, A., Huang, X.Y.** Genetic evidence for a tyrosine kinase cascade preceding the mitogen-activated protein kinase cascade in vertebrate G protein signaling. *J Biol Chem*, (1997), 272:17209-17215.
- Wang, T., Schneider, J.** Cellular junctions on the free surface of human placental syncytium. *Arch Gynecol*, (1987), 240:211-216.
- Wang, Y.H., Maurer, R.A.** A role for the mitogen-activated protein kinase in mediating the ability of thyrotropin-releasing hormone to stimulate the prolactin promoter. *Mol Endocrinol*, (1999), 13:1094-1104.
- Warnat, J., Philipp, S., Zimmer, S., Flockerzi, V., Cavalie, A.** Phenotype of a recombinant store-operated channel: highly selective permeation of Ca²⁺. *J Physiol*, (1999), 518:631-638.

- Warren, W.B., Patrick, S.L., Goland, R.S.** Elevated maternal plasma corticotropin-releasing hormone levels in pregnancies complicated by preterm labor. *Am J Obstet Gynecol*, (1992), 166:1198-1202.
- Warren, W.B., Silverman, A.J.** Cellular localization of corticotropin-releasing hormone in the human placenta, fetal membranes and decidua. *Placenta*, (1995), 16:147-156.
- Waters, W.W., Chen, P.L., McArthur, N.H., Moreno, P.A., Harms, P.G.** Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II involvement in release of gonadotropin-releasing hormone. *Neuroendocrinology*, (1998), 67:145-152.
- Weck, J., Fallest, P.C., Pitt, L.K., Shupnik, M.A.** Differential gonadotropin-releasing hormone stimulation of rat luteinizing hormone subunit gene transcription by calcium influx and mitogen-activated protein kinase-signaling pathways. *Mol Endocrinol*, (1998), 12:451-457.
- Weinberg, D.H., Sirinathsingji, D.J.S., Tan, C.P., Shiao, L-L., Morin, N., Rigby, M.R., Heavens, R.H., Rapoport, D.R., Bayne, M.L., Cascieri, M.A., Strader, C.D., Linemeyer, D.L., MacNeil, D.J.** Cloning and expression of a novel neuropeptide Y receptor. *J Biol Chem*, (1996), 271:16435-16438.
- Wenham, R.M., Landt, M., Walters, S.M., Hidaka, H., Easom, R.A.** Inhibition of insulin secretion by KN-62, a specific inhibitor of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem Biophys Res Commun*, (1992), 189:128-133.

- Weninger, S.C., Dunn, A.J., Muglia, L.J., Dikkes, P., Miczek, K.A., Swiergiel, A.H., Berridge, C.W., Majzoub, J.A.** Stress-induced behaviors require the corticotropin-releasing hormone (CRH) receptor, but not CRH. *Proc Natl Acad Sci USA*, (1999), 96:8283-8288.
- Wharton, J., Gordon, L., Byrne, J., Herzog, H., Selbie, L.A., Moore, K., Sullivan, M.H.F., Elder, M.G., Moscoso, G., Taylor, K.M., Shine, J., Polak, J.M.** Expression of the human neuropeptide tyrosine Y₁ receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, (1993), 90:687-691.
- Whitmarsh, A.J., Davis, R.J.** Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends Biochem Sci*, (1998), 23:481-485.
- Whitsett, J.A.** Specializations in plasma membranes of the human placenta. *J Pediatr*, (1980) 96:600-603.
- Widmaier, E.P.** Metabolic feedback in mammalian endocrine systems. *Horm Metab Res*, (1992), 24:147-153.
- Wieland, H, A., Willim, K., Doods, H.N.** Receptor binding profiles of NPY and fragments in different tissues and cell lines. *Peptides*, (1995a), 16:1389-1394.
- Wieland, H, A., Willim, K., Entzeroth, M., Wienen, W., Rudolf, K., Eberlein, W., Engel, W., Doods, H.N.** Subtype selectivity and antagonistic profile of the neuropeptide Y₁ receptor antagonist BIBP3226. *J Pharmacol Exp Ther*, (1995b), 275:143-149.
- Wilkin, P.** Chapitre premier: organogénèse et vascularisation placentaires. In: Pathologie du placenta. Masson, Paris, (1965), pp2-50.

- Wilson, T., Liggins, G.C., Aimer, G.P., Watkins, E.J.** The effect of progesterone on the release of arachidonic from endometrial cells stimulated by histamine. *Prostaglandins*, (1986), 343-360.
- Winitz, S., Russell, M., Qian, N.X., Gardner, A., Dwyer, L., Johnson, G.L.** Involvement of Ras and Raf in the Gi-coupled acetylcholine muscarinic m2 receptor activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase and MAP kinase. *J Biol Chem*, (1993), 268:19196-19199.
- Winitz, S., Gupta, S.K., Qian, N.X., Heasley, L.E., Nemenoff, R.A., Johnson, G.L.** Expression of a mutant Gi₂ alpha subunit inhibits ATP and thrombin stimulation of cytoplasmic phospholipase A₂-mediated arachidonic acid release independent of Ca²⁺ and mitogen-activated protein kinase regulation. *J Biol Chem*, (1994), 269:1889-1895.
- Wojcikiewicz, R.J.** Type I, II, and III inositol 1,4,5-trisphosphate receptors are unequally susceptible to down-regulation and are expressed in markedly different proportions in different cell types. *J Biol Chem*, (1995), 270:11678-11683.
- Wolfe, C.D., Patel, S.P., Campbell, E.A., Linton, E.A., Anderson, J., Lowry, P.J., Jones, M.T.** Plasma corticotrophin-releasing factor (CRF) in normal pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol*, (1988a), 95:997-1002.
- Wolfe, C.D., Patel, S.P., Linton, E.A., Campbell, E.A., Anderson, J., Dornhorst, A., Lowry, P.J., Jones, M.T.** Plasma corticotrophin-releasing factor (CRF) in abnormal pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol*, (1988), 95:1003-1006.
- Wolkersdorfer, G.W., Bornstein, S.R., Hilbers, U., Zimmermann, G., Biesold, C., Lehmann, M., Alexander, H.** The presence of chorionic gonadotrophin beta subunit in normal cyclic human endometrium. *Mol Hum Reprod*, (1998), 4:179-184.

- Wymann, M.P., Pirola, L.** Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim Biophys Acta*, (1998), 1436:127-150.
- Xiao, Q., Han, X., Arany, E., Hill, D., Challis, J.R., McDonald, T.J.** Human placenta and fetal membranes contain peptide YY1-36 and peptide YY3-36. *J Endocrinol*, (1998), 156:485-492.
- Xing, M., Firestein, B.L., Shen, G.H., Insel, P.A.** Dual role of protein kinase C in the regulation of cPLA2-mediated arachidonic acid release by P2U receptors in MDCK-D1 cells: involvement of MAP kinase-dependent and -independent pathways. *J Clin Invest*, (1997), 99:805-814.
- Xiong, Z., Bolzon, B.J., Cheung, D.W.** Neuropeptide Y potentiates calcium-channel currents in single vascular smooth muscle cells. *Pflügers Arch*, (1993), 423:504-510.
- Yagel, S., Casper, R.F., Powell, W., Parhar, R.S., Lala, P.K.** Characterization of pure human first-trimester cytotrophoblast cells in long-term culture: growth pattern, markers, and hormone production. *Am J Obstet Gynecol*, (1989), 160:938-945.
- Yan, H., Yang, J., Marasco, J., Yamaguchi, K., Brenner, S., Collins, F., Karbon, W.** Cloning and functional expression of cDNAs encoding human and rat pancreatic polypeptide receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, (1996), 93:4661-4665.
- Yang, J., Tsien, R.W.** Enhancement of N- and L-type calcium channel currents by protein kinase C in frog sympathetic neurons. *Neuron*, (1993), 10:127-136.
- Zawalich, W.S., Zawalich, K.C., Ganesan, S., Calle, R., Rasmussen, H.** Influence of staurosporine on glucose-mediated and glucose-conditioned insulin secretion. *Biochem J*, (1991), 279:807-813.

- Zhang, C.L., Chen, L.R., Wang, H., Zhuang, L.Z., Huang, W.Q.** Neuropeptides and neurotransmitters in human placental villi. *Neuroendocrinology*, (1991), 53 (Suppl 1):77-83.
- Zhang, B.X., Zhao, H., Loessberg, P.A., Muallem, S.** Regulation of agonist-evoked $[Ca^{2+}]_i$ oscillation by intracellular Ca^{2+} and Ba^{2+} in AR42J cells. *Am J Physiol*, (1992), 262:C1125-C1133.
- Zhang, B.X., Zhao, H., Muallem, S.** $Ca(2+)$ -dependent kinase and phosphatase control inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated Ca^{2+} release. Modification by agonist stimulation. *J Biol Chem*, (1993), 268:10997-11001.
- Zheng, C.F., Guan, K.L.** Dephosphorylation and inactivation of the mitogen-activated protein kinase by a mitogen-induced Thr/Tyr protein phosphatase. *J Biol Chem*, (1993), 268:16116-16119.
- Zhou, G., Bao, Z.Q., Dixon, J.E.** Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem*, (1995), 270:12665-12669.
- Zhu, X., Jiang, M., Peyton, M., Bouley, G., Hurst, R., Stefani, E., Birnbaumer, L.** *Trp*, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca^{2+} entry. *Cell*, (1996), 85:661-671.
- Zhu, X., Jiang, M., Birnbaumer, L.** Receptor-activated Ca^{2+} influx via human *Trp3* stably expressed in human embryonic kidney (HEK)293 cells. Evidence for a non-capacitative Ca^{2+} entry. *J Biol Chem*, (1998), 273:133-142.
- Zitt, C., Obukhov, A.G., Strubing, C., Zobel, A., Kalkbrenner, F., Luckhoff, A., Schultz, G.** Expression of TRPC3 in Chinese hamster ovary cells results in calcium-activated cation currents not related to store depletion. *J Cell Biol*, (1997), 138:1333-4131.

Zoumakis, E., Makrigiannakis, A., Margioris, A., Stournaras, C., Gravanis, A. Corticotropin releasing hormone (CRH) in normal and pregnant uterus : physiological implications. *Front Biosci*, (1996), 1 :1-8.

Zukowska-Grojec, Z. Neuropeptide Y. A novel sympathetic stress hormone and more. *Ann N Y Acad Sci*, (1995), 771:219-233.

Zukowska-Grojec, Z., Karwatowska-Prokopczuk, E., Fisher, T.A., Ji, H. Mechanism of vascular growth-promoting effects of neuropeptide Y : role of its inducible receptors. *Reg Pept*, (1998), 75-76 :231-238.