Le rôle des kinases *Mek1* et *Mek2* dans la formation de la barrière hématoplacentaire chez la souris

Valérie Nadeau, Vickram Bissonauth, Jean Charron

Centre de recherche en cancérologie de l'université Laval, centre de recherche du centre hospitalier universitaire de Québec, l'Hôtel-Dieu de Québec, 9, rue McMahon, Québec G1R 2J6, Canada.

valerie.nadeau.3@ulaval.ca

v.bissonauth@mrc.intnet.mu

jean.charron@crhdq.ulaval.ca

► La voie de signalisation cellulaire ERK/MAPK (*extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase*) est impliquée dans plusieurs fonctions cellulaires. Chez la souris, l'inactivation de gènes codant pour des membres de cette voie est souvent associée à une mort embryonnaire consécutive à un développement anormal du placenta. Ce dernier est essentiel aux échanges nutritionnels et gazeux entre les circulations maternelle et embryonnaire, ainsi qu'à l'évacuation des déchets métaboliques. Ces échanges s'effectuent sans contact direct entre les deux circulations. Chez la souris, la barrière hématoplacentaire est constituée d'une triple couche de cellules trophoblastiques et de cellules endothéliales de l'embryon. MEK1 (ou MAP/ERK kinase-1) et MEK2 sont des kinases à double spécificité, phosphorylant les résidus sérine/thréonine et tyrosine et responsables de l'activation des kinases ERK1 et ERK2. L'inactivation génique de *Mek1* produit une malformation placentaire résultant de défauts de prolifération et de différenciation des cellules trophoblastiques et entraînant un retard sévère du développement du placenta et la mort de l'embryon. Bien que les mutants *Mek2*^{-/-} survivent sans aucun phénotype apparent, les mutants doubles hétérozygotes *Mek1*^{+/-}*Mek2*^{+/-} meurent au cours de la gestation de malformation placentaire. L'ensemble de ces données souligne le rôle crucial de la voie ERK/MAPK dans la formation des structures extraembryonnaires. ◀

cibles intracellulaires localisées dans la membrane plasmique, le cytoplasme, le cytosquelette ou le noyau [1, 2]. Plusieurs cascades de signalisation MAPK ont été décrites chez les vertébrés. La voie classique ERK/MAPK constitue la voie majeure dans la réponse aux facteurs de croissance. Cette voie utilise les kinases régulées par les signaux extracellulaires, ERK1 et ERK2, ainsi que les kinases MEK1 et MEK2 à double spécificité (sérine/thréonine et tyrosine), qui activent ERK1 et ERK2 en réponse à la liaison de facteurs de croissance à leur récepteur. La voie ERK/MAPK est impliquée dans la détermination cellulaire chez plusieurs espèces. Chez les mammifères, cette cascade est impliquée dans la prolifération, la différenciation, la migration, la survie et la mort cellulaires [3, 4].

La voie d'activation ERK/MAPK débute par la liaison de facteurs de croissance aux récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase, tels les récepteurs du FGF (*fibroblast growth factor*), de l'EGF (*epidermal growth factor*) et du PDGF (*platelet derived growth factor*). Ces récepteurs s'activent par une autophosphorylation suivie du recrutement d'une protéine adaptatrice comme GRB2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) et l'interaction avec SOS-1 (*son of sevenless homolog 1*), un facteur d'échange de GDP/GTP de la petite protéine G RAS. SOS-1 permet le relargage du GDP associé à RAS qui peut alors fixer le GTP et s'activer. RAS activé permet le recrutement et l'activation de la kinase proto-oncogène RAF. Par la suite, les protéines kinases RAF, MEK et ERK s'activent séquentiellement par phosphorylation [5]. À ce jour, les substrats connus des ERK sont nombreux et incluent des protéines du cytosol, du cytosquelette, de la membrane plasmique ainsi que des facteurs de transcription. L'abondance de substrats reflète d'ailleurs

Fonctions essentielles de la voie ERK/MAPK lors du développement placentaire murin

La voie de signalisation ERK/MAPK

Les voies de signalisation MAP kinase (MAPK) sont composées d'une succession de protéines kinases pouvant relayer des signaux extracellulaires aux différentes

Gène	Phénotype	Références
<i>Egfr</i>	Sous-développement de la région du labyrinthe. Diminution de la prolifération des trophoblastes et réduction de la couche de spongiotrophoblastes	[7, 8]
<i>Erk2</i>	Sous-développement de la région du labyrinthe. Défaut de vascularisation se manifestant par une diminution de l'invasion des vaisseaux embryonnaires dans la région du labyrinthe. Les couches trophoblastiques sont plus minces et moins bien définies	[9]
<i>Fgf4</i>	Diminution de la prolifération des trophoblastes	[7, 10]
<i>Fgfr2</i>	Le tiers des mutants présente un défaut de fusion chorio-allantoïde et, conséquemment, le labyrinthe n'est pas formé. Diminution de la prolifération des trophoblastes	[7]
<i>Gab1</i>	Sous-développement et désorganisation de la région du labyrinthe. Réduction sévère du nombre de trophoblastes du labyrinthe	[7]
<i>Grb2</i> hypomorphe	Morphogenèse du labyrinthe affectée. Réduction de l'invasion des vaisseaux embryonnaires dans la région du labyrinthe	[7]
<i>Hgf</i>	Diminution du nombre de trophoblastes dans la région du labyrinthe	[7, 11]
<i>Mek1</i>	Sous-développement de la région du labyrinthe. Diminution de la prolifération des trophoblastes et augmentation de l'apoptose. Important problème de vascularisation, incluant une diminution de l'invasion des vaisseaux embryonnaires dans la région du labyrinthe	[12-14]
<i>Mek1 ; Mek2</i> double hétérozygotes	Phénotype semblable mais moins prononcé que celui des mutants <i>Mek1</i> ^{-/-} Défaut de différenciation des SynT-II	[15]
<i>c-Met</i>	Diminution du nombre de trophoblastes dans la région du labyrinthe. Un phénotype qui est identique au mutant <i>Hgf</i>	[7, 16]
<i>Pdgfrβ</i> et <i>Pdgfrβ</i>	Malformation de la vascularisation embryonnaire dans la région du labyrinthe. Vaisseaux embryonnaires anormalement dilatés et diminution du nombre de trophoblastes	[7]
<i>Pdgfrα</i>	Absence complète de formation du sac vitellin intraplacentaire, ce qui peut compromettre les échanges materno-fœtaux	[7]
<i>B-Raf</i>	Sous-développement du labyrinthe et diminution de la vascularisation embryonnaire. Les trophoblastes du labyrinthe, les cellules trophoblastiques géantes et les spongiotrophoblastes sont affectés	[17]
<i>Raf1</i>	Réduction de la couche des spongiotrophoblastes et diminution du nombre de vaisseaux embryonnaires du labyrinthe	[18]
<i>K-Ras</i> ^{G12D}	Absence de l'invasion de la vascularisation embryonnaire dans la région du labyrinthe	[19]
<i>Sos1</i>	Les spongiotrophoblastes et les couches trophoblastiques du labyrinthe sont hautement désorganisés. La vascularisation embryonnaire du labyrinthe est incomplète. Formation aberrante de trophoblastes multinucléés géants	[7]

Tableau I. Phénotype placentaire des souris mutantes pour des protéines impliquées dans la voie ERK/MAPK.

l'importance de la voie dans un grand nombre de processus cellulaires [2, 6]. Le rôle de la voie ERK/MAPK lors du développement placentaire a été largement démontré chez la souris par la caractérisation de mutants pour des gènes associés à l'activation de la voie. Les mutants *Erk2*, *Fgfr2*, *Gab1* (*GRB2-associated-binding protein 1*), *Mek1*, *Sos1*, *b-Raf*, *Raf-1* et le mutant hypomorphe pour *Grb2* décèdent entre les jours 10,5 et 11,5 de la gestation et présentent tous des anomalies de développement placentaire (Tableau I) [7-19]. Pour l'ensemble de

ces mutants, aucune anormalité morphologique n'est observable chez l'embryon, mais un retard de croissance est noté [7, 20].

Le développement du placenta chez la souris

Chez la souris, le développement du placenta s'effectue en deux phases. Vers le 8,5^e jour de gestation, il y a liaison du mésoderme allantoïde - qui est à l'origine

Figure 1. Structure du placenta de la souris : organisation des différentes couches cellulaires de la région du labyrinthe de souris. **A.** Représentation schématique du placenta de souris (panneau de gauche) et coupe histologique d'un placenta d'un embryon au 12,5^e jour de gestation (panneau de droite). La ligne pointillée sépare les parties maternelle et embryonnaire. **B.** Schéma de l'organisation de la triple couche de trophoblastes et de l'endothélium fœtal dans la région du labyrinthe permettant la formation de la barrière hémotrophoblastaire (panneau de gauche). Visualisation de la double couche de syncytiotrophoblastes par

immunofluorescence avec des anticorps contre les transporteurs de monocarboxylate MCT1 (en rouge) et MCT4 (en vert) (panneau de droite) [24]. MCT1 et MCT4 sont utilisés comme marqueurs spécifiques de la membrane apicale des SynT-I et de la membrane basale des SynT-II, respectivement. Dans cette expérience, les noyaux sont marqués en bleu par une coloration au DAPI. Les érythrocytes maternels sont détectés en orange (du fait de l'autofluorescence), alors que les érythrocytes fœtaux ont un noyau bleu et un cytoplasme verdâtre. Les érythrocytes et les sinus maternels sont délimités par la couche de SynT-I (en rouge), alors que les érythrocytes et les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins fœtaux sont inclus à l'intérieur d'une couche de SynT-II (en vert). Dans le vaisseau sanguin fœtal indiqué (VSF), une cellule endothéliale (CE) accolée sur la partie interne de la couche de SynT-II définie par le marquage MCT4 est visible. Les circulations sanguines fœtale et maternelle sont séparées par trois couches étanches constituées des cellules endothéliales vasculaires fœtales, des SynT-I et des SynT-II. CE, cellule endothéliale ; EF, érythrocyte fœtal ; EM, érythrocyte maternel ; SM, sinus maternel ; SynT-I, syncytiotrophoblaste de type I ; SynT-II, syncytiotrophoblaste de type II ; VSF, vaisseau sanguin fœtal.

de l'élongation de la ligne primitive - à l'épithélium chorionique. Par la suite et en réponse à cette interaction, une série de ramifications entre ces deux tissus va façonner l'aire de surface nécessaire aux échanges, qui constitue la région du labyrinthe [21]. À terme, le placenta est formé de trophoblastes dérivant de l'ectoderme extraembryonnaire et du cône ectoplacentaire, d'une vascularisation fœtale provenant du mésoderme allantoïde dérivé de l'embryon, et du sang maternel qui s'épanche de la vascularisation maternelle dans les sinus maternels du labyrinthe. L'intégrité du tissu placentaire peut donc être affectée par des défauts touchant les tissus embryonnaires, les tissus maternels ou les cellules trophoblastiques du placenta. De plus, des études génétiques ont démontré l'importance des interactions entre ces différents constituants afin d'établir un placenta fonctionnel. Les cellules trophoblastiques ont un rôle primordial de soutien et elles sont activement impliquées dans la vascularisation du placenta [7]. Trois populations trophoblastiques distinctes sont présentes dans le placenta mature. La partie la plus interne est constituée des trophoblastes du labyrinthe (Figure 1A). Elle est juxtaposée à une couche

intermédiaire formée de spongiotrophoblastes. La partie la plus externe comprend les cellules trophoblastiques géantes en contact avec les tissus maternels. Les spongiotrophoblastes ont un rôle structural et sécrètent des facteurs antiangiogéniques qui empêcheraient la croissance des vaisseaux maternels dans la partie fœtale du placenta [22]. Par ailleurs, les cellules trophoblastiques géantes exercent des fonctions précoces qui favorisent l'implantation et l'invasion de l'utérus par l'embryon. Par la suite, les trophoblastes géants, *via* leurs fonctions endocrines, promeuvent les adaptations physiologiques de la mère [23]. Les trophoblastes de la couche interne du labyrinthe comprennent les trophoblastes mononucléés sinusoidaux géants (S-TGC) et une double couche de syncytiotrophoblastes (SynT). Les S-TGC font face aux sinus maternels et sont juxtaposés à la première couche de SynT (SynT-I), elle-même accolée à une deuxième couche de SynT (SynT-II)

Figure 2. Activation différentielle des voies ERK et p38 MAPK dans les cellules du labyrinthe. Le réseau vasculaire embryonnaire est révélé à l'aide d'un anticorps anti-CD31 (*cluster of differentiation 31*) alors que l'activation des voies de signalisation ERK/MAPK et p38/MAPK est mise en évidence avec des anticorps contre les formes phosphorylées de ERK (p-ERK) et de p38 (p-p38), respectivement. Les images sont prises en contraste interférentiel. Les érythrocytes embryonnaires et maternels sont détectables dans les vaisseaux fœtaux (VF) et les sinus maternels (SM), respectivement. Les érythrocytes embryonnaires sont plus gros et nucléés. L'activation de la voie p38/MAPK est restreinte aux vaisseaux sanguins fœtaux alors que l'activation de ERK est localisée en périphérie des sinus maternels. Les flèches noires indiquent les cellules endothéliales vasculaires fœtales et les flèches blanches les trophoblastes bordant les sinus maternels.

naïres sont plus gros et nucléés. L'activation de la voie p38/MAPK est restreinte aux vaisseaux sanguins fœtaux alors que l'activation de ERK est localisée en périphérie des sinus maternels. Les flèches noires indiquent les cellules endothéliales vasculaires fœtales et les flèches blanches les trophoblastes bordant les sinus maternels.

adjacente à l'endothélium fœtal. Les cellules sanguines maternelles et les érythrocytes fœtaux sont donc séparés par une triple couche de cellules trophoblastiques du labyrinthe et par les cellules endothéliales fœtales (*Figure 1B*) [20, 24]. Les S-TGC sont un sous-type de trophoblastes géants pourvus de fonctions endocrines. Les SynT-I et SynT-II sont des cellules postmitotiques multinucléées formées par fusion cellulaire et possédant des fonctions de transport [20, 25]. Ainsi, des anomalies affectant les cellules trophoblastiques ou les cellules endothéliales issues de l'allantoïde peuvent mener à des problèmes de vascularisation placentaire.

Défauts des lignées trophoblastiques chez les mutants de la voie ERK

Mutations de gènes de la voie de signalisation ERK/MAPK et développement labyrinthique

Les techniques d'agrégation d'embryons tétraploïdes¹ et de délétion conditionnelle de gènes chez la souris ont permis de démontrer que la mutation de gènes associés à la voie de signalisation ERK/MAPK (*Gab1*, *Sos1*, *b-Raf*, *Mek1*, *Erk2*) entraîne la mort embryonnaire en raison des malformations placentaires résultant de défauts dans les tissus extraembryonnaires [7, 9, 13, 17, 26]. Chez ces différents mutants, le sous-développement de la région du labyrinthe est associé à une incapacité du mésoderme allantoïde à envahir cette région. Les vaisseaux embryonnaires placentaires chez les mutants ne se retrouvent pas à proximité des sinus maternels, ce qui diminue les échanges gazeux et nutritionnels et cause la mort de l'embryon. À titre d'exemple, la région du labyrinthe des placentas *Mek1*^{-/-} est atrophiée en raison d'une prolifération diminuée et d'une apoptose accrue des tropho-

blastes. De plus, le labyrinthe est hypovascularisé [12-14]. L'utilisation du facteur de transcription codé par le gène *Gcm1* (*glial cells missing homolog 1*) comme marqueur des SynT-II a montré que ce type cellulaire est correctement spécifié dans les placentas *Mek1*^{-/-}, mais que les SynT-II demeurent bloqués à la jonction chorio-allantoïde [13]. Il a été proposé que les SynT-II seraient les cellules responsables de l'émergence de la morphogenèse de la région du labyrinthe, ouvrant ainsi le chemin à la migration des cellules endothéliales [21]. L'incapacité des SynT-II à migrer dans la région du labyrinthe expliquerait l'hypovascularisation du placenta des souris *Mek1*^{-/-}.

Distribution spatiale des protéines MEK1 et MEK2

La distribution spatiale des protéines MEK1 et MEK2 diffère dans le placenta. Alors que la protéine MEK2 est exprimée de façon ubiquitaire, MEK1 est plus fortement exprimée dans les tissus situés entre les sinus maternels et les vaisseaux embryonnaires, possiblement dans les couches trophoblastiques composant la barrière hématoplacentaire [13, 15]. L'analyse des formes phosphorylées de ERK1, ERK2, MEK1 et MEK2 révèle que la voie ERK/MAPK est principalement activée près des sinus maternels (*Figure 2*). Le profil d'expression des membres de la cascade ERK/MAPK, combiné à des études génétiques, a permis de montrer le rôle prépondérant de cette voie dans les tissus du placenta ayant une origine extraembryonnaire (plutôt que dans les cellules endothéliales) pour l'établissement de la barrière hématoplacentaire. En effet, la délétion spécifique du gène *b-Raf* dans les cellules endothéliales à l'aide de la lignée transgénique *Tie2-Cre* ou encore la délétion du gène *Mek1* par la recombinaison *Sox2-Cre* dans tous les tissus embryonnaires (incluant l'allantoïde), ne génère aucun défaut placentaire et

¹ « On peut aussi obtenir le développement complet d'une souris indépendamment de la transmission germinale via des expériences dites de "complémentation d'embryons tétraploïdes", ce qui représente le *gold standard* des tests de pluripotence. Cela consiste à agréger les cellules à tester avec des embryons tétraploïdes (obtenus par électrofusion d'embryons au stade 2 cellules), et à réimplanter l'agrégat dans l'utérus d'une femelle gravide. On peut aussi injecter les cellules à tester dans l'embryon tétraploïde après l'avoir cultivé jusqu'au stade blastocyste *in vitro*. A. Nagy a montré il y a vingt ans que les cellules embryonnaires tétraploïdes ne pouvaient pas (ou dans une très faible proportion et transitoirement) se développer en un embryon et contribuaient exclusivement aux annexes » (repris de [43]).

aucune mort de l'embryon puisque ces gènes demeurent fonctionnels dans les cellules trophoblastiques [13, 17]. Bien qu'il ait été rapporté que l'activation de ERK dans le placenta se produisait près des vaisseaux embryonnaires [17], la majorité des données obtenues à ce jour supportent plutôt un rôle crucial de la voie ERK/MAPK dans les tissus extraembryonnaires pour la formation du placenta.

Voie ERK/MAPK et expression du VEGF

La voie ERK/MAPK joue un rôle important dans le maintien de l'expression du VEGF (*vascular endothelial growth factor*). Chez les souris mutantes *b-Raf*, l'expression du VEGF est diminuée. En revanche, la délétion spécifique de *b-Raf* dans les cellules endothéliales n'a pas d'effet sur la formation du placenta, suggérant que le phénotype placentaire observé chez la souris *b-Raf*^{-/-} est causé par une perte d'expression de VEGF dans les tissus placentaires autres que les cellules endothéliales [17]. Chez les mutants *Mek1*, l'expression du gène *Vegf* est fortement augmentée indiquant une hypoxie au niveau du placenta causée par l'absence de développement du labyrinthe [13]. L'augmentation d'expression de *Vegf* corrèle avec une augmentation de l'activation de p38/MAPK [13]. La voie p38/MAPK est impliquée dans la réponse au VEGF lors de l'angiogenèse et elle est fortement activée dans les cellules endothéliales du placenta en formation (Figure 2) [27]. Ces résultats montrent que l'expression du VEGF est dépendante de *b-Raf*, mais indépendante de l'activation de ERK par MEK1. Une explication possible serait que MEK2 pourrait compenser la perte de MEK1. Une autre hypothèse serait qu'en absence de MEK1, l'activation de la voie ERK/MAPK serait soutenue puisqu'elle utiliserait uniquement MEK2. En effet, il a été montré que MEK1 est essentielle pour la boucle de rétro-inhibition de la voie par la phosphorylation de l'hétérodimère MEK1-MEK2 par ERK. En absence de MEK1, l'activation de ERK par MEK2 pourrait être moindre, bien que stabilisée [14]. Ainsi, le maintien de l'activation de la voie ERK/MAPK pourrait mener à une augmentation de l'expression de VEGF. Cependant, l'analyse de l'activation de ERK dans les placentas *Mek1*^{-/-} n'a pour l'instant pas permis de confirmer cette dernière hypothèse [13, 14].

Rôle de la voie ERK/MAPK dans les SynT-II

Les embryons *Mek1*^{-/-} meurent à mi-gestation alors que les souris *Mek2*^{-/-} survivent sans aucun phénotype apparent [13, 28]. En revanche, une majorité des mutants *Mek1*^{+/-}*Mek2*^{+/-} meurent au stade E14,5 en raison d'anomalies au niveau des trophoblastes, révélant ainsi que *Mek2* joue également un rôle lors du développement du placenta. L'haplo-insuffisance de *Mek2* lorsqu'un allèle de *Mek1* est absent, engendre un sous-développement de la région du labyrinthe et une diminution de la vascularisation. Ce phénotype, semblable à celui des mutants *Mek1*^{-/-}, est néanmoins moins prononcé et moins pénétrant. De plus, les placentas *Mek1*^{+/-}*Mek2*^{+/-} présentent une accumulation de structures anormales composées de cellules multinucléées trophoblastiques géantes (MTG) localisées dans le labyrinthe. Des études génétiques de lignage cellulaire *in vivo*, utilisant la lignée de souris transgénique *Gcm1Cre* et le gène rapporteur *Rosa26-LacZ*, ont permis

de montrer que les cellules MTG dérivent des SynT-II [15]. Par ailleurs, l'utilisation de marqueurs cellulaires a révélé que les cellules MTG n'expriment plus le gène *Gcm1*. Ces résultats suggèrent que la voie ERK/MAPK est impliquée dans le maintien de l'expression de *Gcm1*, mais non dans l'initiation de sa transcription, comme précédemment démontré chez l'oursin de mer pour le gène *spgcm*, l'homologue de *Gcm1* [29]. En accord avec cette hypothèse, l'activation de la voie ERK/MAPK est perdue dans les cellules MTG alors qu'elle est maintenue dans les SynT des régions exemptes de MTG. Dans les placentas d'embryons *Mek2*^{+/-}, la délétion conditionnelle d'un allèle de *Mek1* spécifiquement dans les SynT-II est suffisante pour générer des cellules MTG, démontrant l'importance de MEK1 dans les SynT-II lorsque les niveaux d'expression de *Mek2* sont diminués [15]. En revanche, le phénotype est moins prononcé que celui observé dans les placentas *Mek1*^{-/-}*Mek2*^{+/-}, ce qui suggère un rôle plus large de MEK1 dans d'autres types cellulaires du placenta. Des structures semblables aux cellules MTG ont aussi été rapportées pour les mutants *Sos1* et *b-Raf* [17, 30]. Puisque SOS1 et b-RAF se situent en amont de ERK dans la voie, ces données suggèrent qu'ils pourraient participer à l'activation spécifique de ERK dans les SynT-II afin de promouvoir une différenciation et/ou une polarisation adéquate de ces cellules.

Pparγ et *Lbp-1a* : cibles potentielles de la voie ERK/MAPK dans la formation du placenta

Les souris mutantes pour les gènes *Pparγ* (*peroxisome proliferator-activated γ*) et *Lbp-1a* (ou *upstream binding protein 1*) présentent aussi des phénotypes placentaires semblables à ceux qui sont observés chez les mutants *Mek* [31-33]. PPARγ est un récepteur nucléaire impliqué dans plusieurs fonctions dont la différenciation, la prolifération, le métabolisme tissulaire et l'immunité de l'hôte [34, 35]. L'inactivation de ce gène provoque une mortalité embryonnaire à mi-gestation due à un défaut dans les lignées trophoblastiques [33, 36]. Le labyrinthe des placentas *Pparγ*^{-/-} est atrophié et sa vascularisation est désorganisée. Les trophoblastes du labyrinthe des placentas d'embryons *Pparγ*^{-/-} présentent des défauts de différenciation affectant la formation du syncytium. De plus, des structures semblables aux cellules MTG sont présentes dans les placentas des spécimens mutants [36]. Le gène *Pparγ* est exprimé de façon ubiquitaire au niveau des trophoblastes du labyrinthe. L'étude des placentas *Pparγ*^{-/-} en microscopie électronique a révélé un déficit dans l'accumulation de gouttelettes lipidiques dans les SynT-II indiquant

un problème de différenciation en plus d'une adhésion inadéquate à l'endothélium [33]. L'analyse des cellules souches trophoblastiques *Pparγ*^{-/-} a aussi mis en évidence le rôle de PPARγ dans le contrôle de la transcription des gènes *Muc1* codant pour la glycoprotéine mucine 1 et *Gcm1* codant pour le *chorion-specific transcription factor 1* [31]. *Gcm1* est exprimé spécifiquement dans les SynT-II et est impliqué dans leur différenciation [37]. Pour sa part, l'expression de *Muc1* est restreinte à la bordure des sinus maternels (SynT-I ou S-TGC), ce qui suggère un rôle pour PPARγ dans les SynT-I, SynT-II et/ou S-TGC. Par ailleurs, le phénotype placentaire partiel des mutants *Muc1*^{-/-} suggère que les fonctions essentielles de PPARγ sont relayées par d'autres cibles lors de la formation du placenta [38].

PPARγ est une cible connue de la voie ERK/MAPK [34, 39, 40]. La phosphorylation de PPARγ par ERK contribue à la réduction de son activité transcriptionnelle induite par les facteurs de croissance [39]. De plus, il a été démontré que MEK1 peut interagir directement avec PPARγ et induire son transport dans le cytoplasme indépendamment de la phosphorylation de PPARγ par ERK [34]. Ce transport nucléaire, réalisé par l'intermédiaire de MEK1, atténue l'activité de PPARγ. Par ailleurs, l'activation de ERK favorise la phosphorylation de facteurs de transcription, contrôlant positivement l'expression de PPARγ et de C/EBPα (*CCAAT enhancer binding protein α*) dans les cellules préadipocytaires afin d'induire leur différenciation [40]. Ainsi, l'activité de PPARγ devrait être finement modulée par la voie ERK dans certains types cellulaires, suggérant l'existence d'une régulation semblable pour la différenciation adéquate des trophoblastes.

Pour leur part, les mutants *Lbp-1a*^{-/-} meurent à mi-gestation d'un sous-développement de la région du labyrinthe. Les vaisseaux embryonnaires ne pénètrent pas en profondeur la région du labyrinthe, ce qui s'accompagne d'une désorganisation vasculaire et d'une insuffisance placentaire. De plus, chez ces mutants, des structures semblables aux cellules MTG sont détectées. En revanche, l'expression des marqueurs de différenciation trophoblastique demeure intacte et les expériences d'agrégation avec des cellules tétraploïdes de type sauvage ne corrigent pas le phénotype placentaire des mutants *Lbp-1a* [32]. Donc, contrairement aux mutants associés à l'activation de la voie ERK/MAPK, les mutants *Lbp-1a* meurent à la suite d'un défaut primaire dans les tissus provenant de l'allantoïde. Les protéines LBP-1 sont phosphorylées par ERK, ce qui potentialise leur activité de liaison à l'ADN et leur activité transcriptionnelle [41, 42].

Conclusion

Le développement du labyrinthe dépend d'actions cellulaires non autonomes, telles que la production de facteurs paracrines embryonnaires sécrétés par l'allantoïde vers le chorion pour induire l'invagination des SynT-II dans la région du labyrinthe et permettre l'établissement de réseaux vasculaires fonctionnels [22]. Chez les mutants *Mek1*^{+/-}*Mek2*^{+/-}, la perte de vascularisation au niveau du placenta et la formation de cellules MTG seraient dues à l'absence de fonction de la kinase MEK1 dans les SynT-II [15]. Cependant, cette hypothèse provient d'expériences de délétion spécifique de *Mek1* dans les SynT-II

effectuées dans un environnement hétérozygote pour *Mek2*. Il ne peut donc être exclu que la perte d'un allèle de *Mek2* dans l'allantoïde ou un autre tissu puisse contribuer au phénotype en influençant le niveau de phosphorylation de LBP-1a et son activité transcriptionnelle. Ainsi, on peut supposer que les protéines LBP-1 pourraient permettre la production de signaux par les tissus de l'allantoïde qui seraient intégrés par la voie ERK/MAPK dans les SynT-II. La voie ERK/MAPK jouerait donc un rôle dans différents types cellulaires du placenta autant pour réguler la production de signaux que pour leur intégration.

L'ensemble de ces données démontre l'importance de la voie ERK/MAPK dans l'organogenèse du placenta en participant à l'établissement de la région d'échanges materno-fœtaux, le labyrinthe. Cette région est composée de tissus d'origine extraembryonnaire (les trophoblastes) et embryonnaire (l'allantoïde). Une signalisation inadéquate de la voie ERK/MAPK dans les structures extraembryonnaires compromet la viabilité de l'embryon. Ainsi, la voie ERK/MAPK participe à la prolifération et la survie des trophoblastes ce qui permet la croissance de la région du labyrinthe. De plus, cette voie participe à la différenciation des SynT-II et, ainsi, à l'établissement de la barrière hématoplacentaire. Des études génétiques futures permettront d'élucider si la voie ERK/MAPK a un rôle dans d'autres types cellulaires trophoblastiques. De plus, les cibles cellulaires et les mécanismes contrôlés par cette voie restent encore à identifier. ♦

SUMMARY

Mek1 and Mek2 functions in the formation of the blood placental barrier

The ERK/MAPK signaling pathway is involved in several cellular functions. Inactivation in mice of genes encoding members of this pathway is often associated with embryonic death resulting from abnormal placental development. The placenta is essential for nutritional and gaseous exchanges between maternal and embryonic circulations, as well as for the removal of metabolic wastes. These exchanges take place without direct contact between the two circulations. In mice, the hemotoplacental barrier consists in a triple layer of trophoblast cells and endothelial cells of the embryo. MEK1 and MEK2 are double specificity serine-threonine/tyrosine kinases responsible for the activation of ERK1 and ERK2. *Mek1* inactivation results in placental anomalies due to trophoblast cell proliferation and differentiation defects leading to severe delays in the development of placenta and causing the death of the embryo. Although *Mek2*^{-/-} mutant mice survived without any apparent phenotype,

double hétérozygote *Mek1^{-/-}Mek2^{-/-}* mutants die during gestation from placental malformations. Together, these data emphasize the crucial role of the ERK/MAPK cascade in the formation of extraembryonic structures. ♦

CONFLIT D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient les Drs Lucie Jeannotte et Olivier Boucherat pour leurs commentaires éclairés. Les travaux présentés bénéficient du support financier des instituts de recherche en santé du Canada (MOP-97801).

RÉFÉRENCES

- Rubinfeld H, Seger R. The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. *Mol Biotechnol* 2005 ; 31 : 151-74.
- Wortzel I, Seger R. The ERK cascade: distinct functions within various subcellular organelles. *Genes Cancer* 2011 ; 2 : 195-209.
- Fischer A, Katayama C, Pages G, et al. The role of erk1 and erk2 in multiple stages of T cell development. *Immunity* 2005 ; 23 : 431-43.
- Ussar S, Voss T. MEK1 and MEK2, different regulators of the G1/S transition. *J Biol Chem* 2004 ; 279 : 43861-9.
- Orton RJ, Sturm OE, Vyshemirsky V, et al. Computational modelling of the receptor-tyrosine-kinase-activated MAPK pathway. *Biochem J* 2005 ; 392 : 249-61.
- Shaul YD, Seger R. The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochim Biophys Acta* 2007 ; 1773 : 1213-26.
- Rossant J, Cross J. Placental development: lessons from mouse mutants. *Nat Rev Genet* 2001 ; 2 : 538-48.
- Dackor J, Strunk KE, Wehmeyer MM, Threadgill DW. Altered trophoblast proliferation is insufficient to account for placental dysfunction in *Egfr* null embryos. *Placenta* 2007 ; 28 : 1211-8.
- Hatano N, Mori Y, Oh-Hora M, et al. Essential role for ERK2 mitogen-activated protein kinase in placental development. *Genes Cells* 2003 ; 8 : 847-56.
- Goldin SN, Papaioannou VE. Paracrine action of FGF4 during periimplantation development maintains trophoblast and primitive endoderm. *Genesis* 2003 ; 36 : 40-7.
- Schmidt C, Blatt F, Goedecke S, et al. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 1995 ; 373 : 699-702.
- Giroux S, Tremblay M, Bernard D, et al. Embryonic death of *Mek1*-deficient mice reveals a role for this kinase in angiogenesis in the labyrinthine region of the placenta. *Curr Biol* 1999 ; 9 : 369-72.
- Bissonauth V, Roy S, Gravel M, et al. Requirement for Map2k1 (*Mek1*) in extra-embryonic ectoderm during placentogenesis. *Development* 2006 ; 133 : 3429-40.
- Catalanotti F, Reyes G, Jesenberger V, et al. A *Mek1-Mek2* heterodimer determines the strength and duration of the Erk signal. *Nat Struct Mol Biol* 2009 ; 16 : 294-303.
- Nadeau V, Guillemette S, Bélanger L-F, et al. Map2k1 and Map2k2 genes contribute to the normal development of syncytiotrophoblasts during placentation. *Development* 2009 ; 136 : 1363-74.
- Sachs M, Brohmann H, Zechner D, et al. Essential role of Gab1 for signaling by the c-Met receptor *in vivo*. *J Cell Biol* 2000 ; 150 : 1375-84.
- Galabova-Kovacs G, Matzen D, Piazzolla D, et al. Essential role of B-Raf in ERK activation during extraembryonic development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006 ; 103 : 1325-30.
- Huser M, Luckett J, Chiloeches A, et al. MEK kinase activity is not necessary for Raf-1 function. *EMBO J* 2001 ; 20 : 1940-51.
- Shaw AT, Meissner A, Dowdle JA, et al. Sprouty-2 regulates oncogenic K-ras in lung development and tumorigenesis. *Genes Dev* 2007 ; 21 : 694-707.
- Watson ED, Cross JC. Development of structures and transport functions in the mouse placenta. *Physiology (Bethesda)* 2005 ; 20 : 180-93.
- Cross JC, Nakano H, Natale DRC, et al. Branching morphogenesis during development of placental villi. *Differentiation* 2006 ; 74 : 393-401.
- Cross JC. How to make a placenta: mechanisms of trophoblast cell differentiation in mice: a review. *Placenta* 2005 ; 26 (suppl A) : S3-9.
- Cross J. Genetic insights into trophoblast differentiation and placental morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2000 ; 11 : 105-13.
- Nagai A, Takebe K, Nio-Kobayashi J, et al. Cellular expression of the monocarboxylate transporter (MCT) family in the placenta of mice. *Placenta* 2010 ; 31 : 126-33.
- Simmons DG, Natale DRC, Begay V, et al. Early patterning of the chorion leads to the trilaminar trophoblast cell structure in the placental labyrinth. *Development* 2008 ; 135 : 2083-91.
- Charron J, Jeannotte L. Le rôle essentiel de MEK1 lors de l'angiogenèse placentaire. *Med Sci (Paris)* 1999 ; 15 : 1155-7.
- Gee E, Milkiewicz M, Haas TL. p38 MAPK activity is stimulated by vascular endothelial growth factor receptor 2 activation and is essential for shear stress-induced angiogenesis. *J Cell Physiol* 2010 ; 222 : 120-6.
- Bélanger LF, Roy S, Tremblay M, et al. *Mek2* is dispensable for mouse growth and development. *Mol Cell Biol* 2003 ; 23 : 4778-87.
- Fernandez-Serra M, Consales C, Livigni A, Arnane MI. Role of the ERK-mediated signaling pathway in mesenchyme formation and differentiation in the sea urchin embryo. *Dev Biol* 2004 ; 268 : 384-402.
- Qian X, Esteban L, Vass W, et al. The *Sos1* and *Sos2* Ras-specific exchange factors: differences in placental expression and signaling properties. *EMBO J* 2000 ; 19 : 642-54.
- Parast MM, Yu H, Ciric A, et al. PPARgamma regulates trophoblast proliferation and promotes labyrinthine trilineage differentiation. *PLoS One* 2009 ; 4 : e8055.
- Parekh V, McEwen A, Barbour V, et al. Defective extraembryonic angiogenesis in mice lacking LBP-1a, a member of the grainyhead family of transcription factors. *Mol Cell Biol* 2004 ; 24 : 7113-29.
- Barak Y, Nelson MC, Ong ES, et al. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 1999 ; 4 : 585-95.
- Burgermeister E, Chuderland D, Hanoch T, et al. Interaction with MEK causes nuclear export and downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol Cell Biol* 2007 ; 27 : 803-17.
- Froment P, Gizard F, Staels B, et al. Un rôle pour PPARγ dans la reproduction ? *Med Sci (Paris)* 2005 ; 21 : 507-11.
- Kubota N, Terauchi Y, Miki H, et al. PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell* 1999 ; 4 : 597-609.
- Cross JC, Anson-Cartwright L, Scott IC. Transcription factors underlying the development and endocrine functions of the placenta. *Recent Prog Horm Res* 2002 ; 57 : 221-34.
- Shalom-Barak T, Nicholas JM, Wang Y, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma controls *Muc1* transcription in trophoblasts. *Mol Cell Biol* 2004 ; 24 : 10661-9.
- Camp HS, Tafuri SR. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1997 ; 272 : 10811-6.
- Prusty D. Activation of MEK/ERK signaling promotes adipogenesis by enhancing peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and C/EBPalpha gene expression during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 46226-32.
- Pagon Z, Volker J, Cooper GM, Hansen U. Mammalian transcription factor LSF is a target of ERK signaling. *J Cell Biochem* 2003 ; 89 : 733-46.
- Volker JL, Rameh LE, Zhu Q, et al. Mitogenic stimulation of resting T cells causes rapid phosphorylation of the transcription factor LSF and increased DNA-binding activity. *Genes Dev* 1997 ; 11 : 1435-46.
- Coulombel L. Pluripotency: une définition à géométrie variable. *Med Sci (Paris)* 2009 ; 25 : 798-801.

TIRÉS À PART

J. Charron

Tarifs d'abonnement m/s - 2012

Abonnez-vous

à médecine/sciences

> Grâce à m/s, vivez en direct les progrès des sciences biologiques et médicales

Bulletin d'abonnement
page 438 dans ce numéro de m/s