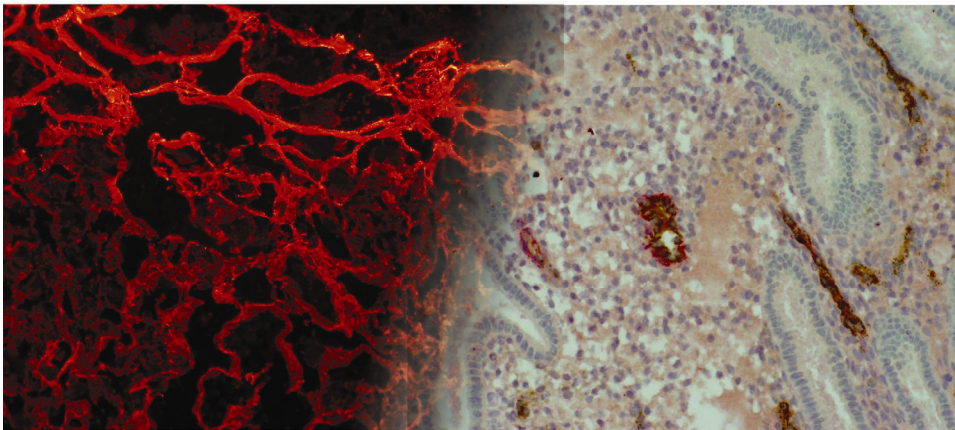

Laboratoire de Biologie des Tumeurs et du Développement

**Promoteurs : Professeur J.-M. Foidart
Professeur Francis Frankenne**

***Rôles des protéases et de leurs inhibiteurs
dans la placentation et la vascularisation
endométriale***



Thouraya Labied

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences
Biomédicales et Pharmaceutiques

Année académique 2008-2009

Remerciements

Comme le veut la tradition, je vais tenter de remercier toutes les personnes qui m'ont aidée directement et indirectement à la réalisation de ce travail de thèse. Cette tâche est pour moi la partie la plus difficile de ce manuscrit, car les mots «sincères» qui expriment ma gratitude à chaque membre du laboratoire ne sont écrits ni dans les articles ni dans les livres. D'ailleurs, je tiens à m'excuser par avance de la longue liste qui va suivre car les personnes que je souhaite remercier sont nombreuses.

Tout d'abord, je tiens à exprimer mes remerciements **aux membres du jury**, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Que Monsieur **le Professeur Jean-Michel Foidart**, reçoive toute l'expression de ma reconnaissance pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et m'avoir permis de travailler dans différentes voies de la reproduction. Monsieur Foidart, je tiens également à vous remercier pour tout le temps que vous m'avez consacré lors de discussions scientifiques et pour les corrections des publications.

Je souhaite particulièrement remercier le Professeur Francis Frankenne. **Francis**, sans votre encadrement et votre éducation scientifique, ce travail de thèse n'aurait pas pu être réalisé. Je vous remercie infiniment de m'avoir fait confiance et de m'avoir guidée durant toutes ces années de recherche. Votre gentillesse et votre présence à tous les moments, tant scientifiques que personnels ont été des éléments clés dans mon épanouissement professionnel. **Merci**.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au Professeur Agnès Noël. **Agnès**, je te remercie pour ton accueil au sein du laboratoire, mais également pour le temps que tu as bien gentiment consacré à la lecture de mes publications et aux projets scientifiques. Même si mon sujet de recherche ne m'a pas permis de travailler directement avec toi, sache que ton enthousiasme et ton dynamisme ainsi que ta persévérance avec les éditeurs et les reviewers m'ont beaucoup motivée durant ces années.

Je remercie vivement le Professeur **Michelle Nisolle** avec qui j'ai eu l'immense plaisir de travailler sur toute la partie endomètre. Je vous remercie pour votre gentillesse et l'intérêt que vous avez porté à mes travaux de recherches. Votre contribution a été un des piliers de mon travail.

J'adresse également mes remerciements aux **Docteurs Jan Brosens, Georgia Zoumoupilidou et Julia Francis** de m'avoir agréablement accueillie et aidée au sein de leur unité IRDB au Hammersmith hospital lors de mon séjour londonien.

Je remercie tout particulièrement le **Docteur Silvia Blacher** (super woman imagerie) pour tout le travail qu'elle a réalisé sur une grande partie de mes recherches, et toujours dans la bonne humeur.

Remerciements

Mes vifs remerciements sont également adressés au **Docteur Carine Munaut**. Carine, merci pour ton aide et tes conseils précieux qui m'ont permis de mener à bien ce travail. Merci pour les agréables moments qu'on a passé ensemble avec toute l'équipe «congrès et EMBIC». J'espère que nos parcours scientifiques se croiseront encore.

Un grand merci aux Docteurs **Aude Béliard** et **Olivier Peulen** pour la contribution scientifique qu'ils ont apportée à ce manuscrit, pour leur esprit critique lors de ce travail et leur disponibilité.

Je tiens à remercier le Professeur **Etienne Marbaix** et le Docteur **Christine Galant** pour leur fructueuse collaboration.

Au cours de ces années de thèse, j'ai également eu l'immense plaisir de travailler avec les Docteurs **Erik Maquoi**, **Christine Gilles** et **Vincent Lambert** (informatic helper) que je remercie pour leur disponibilité.

Stéphanie, je voudrais simplement te dire que j'ai eu un immense plaisir à travailler avec toi. Avec ta sympathie et ton organisation, notre collaboration s'est déroulée sans l'ombre d'un conflit. J'espère avoir encore l'occasion de travailler avec toi. Qui sait ? Si nos professions nous séparent, tu restes de toute manière une copine chère. Je te souhaite bonne chance dans ta vie tant professionnelle que personnelle.

Je souhaite remercier mes copines de bureau, **Françoise** (la spontanée) et **Julie** (la curieuse) pour leurs joies de vivre et pour tous les services qu'elles ont pu me rendre. Elles ont joué un grand rôle durant ce travail, spécialement lors de la rédaction de cette thèse. Nos conversations scientifiques (ex: utérus de baleine et différence entre brebis et mouton) ont été d'un grand intérêt.

Une des grandes forces de ce laboratoire, ce sont les techniciens à qui je tiens à adresser mes vifs remerciements. **Fabrice**, merci de m'avoir appris à manipuler les souris. Merci de t'organiser pour être présent à chaque fois qu'on a besoin de toi et enfin merci de m'avoir classée dans le tiroir. Je remercie infiniment **Erika** et **Nathalie** pour tout le travail impeccablement réalisé sur une partie de mon travail de thèse. Je remercie **Dany** qui, sans elle, mes zymogrammes n'auraient jamais atteint la perfection. Merci à **Benoît Browsers** pour toute la partie microarray et son aide informatique. Je voudrais également remercier **Marie-Rose** pour ces conseils précieux et l'organisation qui règne en salle de migration. **Grand Guy**, je te remercie de ne pas rater l'occasion de nous effrayer mais également de veiller sur nos commandes et notre Matrigel. Nos discussions en arabe m'ont beaucoup amusée durant ces années de thèse. Je voudrais également remercier chaleureusement l'histologie team. Merci à **Patricia** et **Isabelle** de m'avoir appris tout ce que je connais aujourd'hui sur les immunomarquages. Merci à **Emilie**, **Laurence** et **Coralie** de répondre présentes à toutes nos exigences et demandes qui ne sont pas toujours faciles. Merci à **Laurette** et **Marie** avec qui je n'ai pas eu l'occasion de travailler.

Remerciements

Un remerciement particulier à **Hélène** et **Karin** pour la multitude de services qu'elles rendent tous les jours à tous les membres du LBTD. Merci pour toute l'aide que vous avez pu m'apporter avec tant de sympathie et de gentillesse.

Je remercie tous les autres membres du LBTD pour la bonne humeur qu'ils font régner au laboratoire. Ces années de thèse ont été un réel plaisir en votre compagnie.

Je tiens également à remercier mes ex-voisines de bureau, **Christine Grignet**, qui m'a beaucoup aidée à acquérir le sens de l'organisation (ce n'est pas pour ça que mon bureau est mieux rangé), et **Maria Colombo** qui était mon experte privée en protéine.

Je remercie également Madame **Eliane Welliquet** et Madame **Colette Gerday** pour leur sympathie et leur aide.

Une petite pensée à toute l'équipe du **CPMA** de l'hôpital de la Citadelle qui m'a chaleureusement accueillie au sein du service.

Maud, je t'ai laissé parmi les derniers car tu fais simplement partie de la famille. Merci pour ta spontanéité et ton aide à tout moment. Merci aussi pour ton amitié.

Je ne remercierais jamais assez toute ma famille belgo-tunisienne dont chaque membre a contribué à sa façon à mon éducation et à tous les moments de joie que j'ai pu vivre. Merci **Monia**, **Maman**, **Robert**, **Kaouthour**, **Marlène** et **Papa**.

Enfin un grand merci à mon mari, **Saab**, qui me soutient depuis toujours et à mon cœur d'amour, **Yessin**, qui est ma raison d'être. Merci à vous d'être tout simplement présents dans ma vie.

A mes grands parents



Liste des abréviations

AA:	Acide aminé
Adm:	Adrénomédulline
AF:	Activation function
aFGF:	Acid fibroblast growth factor
Ang:	Angiopoïétine
AP:	Activator protein
bFGF:	Basic fibroblast growth factor
bHLH:	Basic helix-loop-helix
CD:	Cluster of differentiation
Cox:	Cyclo-oxygénase
CSF:	Colony stimulating factor
DBD:	DNA binding domain
DI:	Domaine de dimérisation
EGF:	Epidermal growth factor
eNOS:	Endothelial nitric oxide synthase
ER:	Estrogen receptor
ERE:	Estrogen response element
FGF:	Fibroblast growth factor
FLT-1:	Fms-like tyrosine kinase-1
FLT-4:	Fms-like tyrosine kinase-4
FSH:	Follicule stimulating hormone
HB-EGF:	Heparin binding epidermal growth factor
HCG:	Hormone gonadotrophine chorionique
HIF-A:	Hypoxia inducible factor-1
Hsp:	Heat shock protein
IGFBP:	Insulin growth factor-binding protein
IL:	Interleukine
IκB:	Inhibitor of NF κ B.
KDR/Flk-1:	Fetal liver kinase-1
KO:	Knock out
LBD:	Ligand binding domain
LDLR:	Low density lipoprotein receptor
LH:	Luteinizing hormone
LIF:	Leukemia inhibitory factor
LNG:	Levonorgestrel
MCI:	Masse cellulaire interne
MCP:	Monocyte chemoattractant protein
MEC:	Matrice extracellulaire
MHC:	Myosin heavy chain
MMP:	Métalloprotease
MT-MMP:	Membrane type-matrix metalloproteinase
Muc-1:	Mucine-1
NFκB:	Nuclear factor-kappa B
NK:	Natural killer
NTD:	N-terminal domain
PAI:	Plasminogen activator inhibitor
PCI:	Protein C inhibitor
PDGF:	Platelet derived growth factor
PEA-3:	Polyomavirus enhancer activator-3
PGDH:	Prostaglandine déshydrogénase
PGI:	Glycosyl-phosphatidyl-inositol
Pif:	Prolifrine

Liste des abréviations

Plg:	Plasminogène
PLGF:	Placental-like growth factor
PR:	Progesterone receptor
PRE:	Progesterone response element
Prp:	Proliferine related protein
Rantes:	Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted
RCL:	Reactive central loop
Sc-tPA:	Single chain tPA
Sc-uPA:	Single chain-uPA
SHBG:	Sex hormone binding globulin
SIU-LNG:	Système intra-utérin à libération de lévonorgestrel
SMA:	Smooth muscle cells
SMB:	Somatomédine B
Sp:	Binding site
TGF:	Tumor growth factor
Tie:	Récepteur de type tyrosine kinase
TIE:	TGF β inhibitor element
TIMP:	Tissue inhibitor of metalloproteinases
TNFα:	Tumor necrosis factor α
tPA:	Tissular plasminogen activator
TSP:	Thrombospondine
uNK:	Uterine natural killer
uPA:	Urokinase plasminogen activator
uPAR:	Récepteur à l'uPA
VEGF:	Vascular endothelial growth factor

I-AVANT PROPOS	1
II-INTRODUCTION	3
1. LA REPRODUCTION HUMAINE.....	3
1.1 <i>Physiologie de l'endomètre</i>	3
1.1.1 <i>Les hormones stéroïdiennes et leurs récepteurs</i>	4
1.1.1.1 L'œstrogène et ses récepteurs (ER, estrogen receptor).....	4
1.1.1.2 La progestérone et ses récepteurs (PR, progesterone receptor).....	6
1.1.1.3 Mécanisme d'action des récepteurs stéroïdiens.....	8
1.2 <i>Le cycle menstruel</i>	9
1.2.1 <i>La phase folliculaire</i>	10
1.2.2 <i>La phase lutéale</i>	10
1.2.3 <i>La phase menstruelle</i>	11
1.3 <i>L'angiogenèse</i>	14
1.3.1 <i>Les types de néovascularisation</i>	14
1.3.1.1 La vasculogenèse.....	14
1.3.1.2 L'angiogenèse.....	14
1.3.1.3 La lymphangiogenèse.....	16
1.3.2 <i>Les régulateurs de l'angiogenèse</i>	16
1.3.2.1 La famille du vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).....	16
1.3.2.2 La famille du Fibroblast Growth Factor (FGF).....	17
1.3.2.3 Les inhibiteurs de l'angiogenèse.....	17
1.3.3 <i>La maturation vasculaire</i>	18
1.3.3.1 Le Platelet Derived Growth Factor (PDGF).....	19
1.3.3.2 Les angiopoïétines (Ang).....	19
1.3.4 <i>L'angiogenèse endométriale</i>	20
1.3.4.1 Mécanisme de la néovascularisation endométriale.....	20
1.3.4.2 Contrôle hormonal de la néovascularisation endométriale.....	21
1.3.4.3 Les acteurs de l'angiogenèse endométriale.....	23
1.4 <i>Progestatifs et endomètre</i>	26
1.4.1 <i>Les progestatifs</i>	26
1.4.1.1 Classification des progestatifs.....	26
1.4.1.2 Les modes de contraceptions.....	27
1.4.1.3 Le Mirena®.....	28
1.4.2 <i>Les effets du Levonorgestrel sur l'endomètre</i>	30
1.4.2.1 Histologie générale de l'endomètre sous LNG.....	30
1.4.2.2 Saignements irréguliers et dégradation tissulaire.....	31
1.4.2.3 Saignements irréguliers et réseau vasculaire.....	31
2. LA REPRODUCTION MURINE.....	32
2.1 <i>Physiologie de l'endomètre</i>	32
2.1.1 <i>Système reproducteur femelle de la souris</i>	32
2.1.2 <i>Le cycle ovarien</i>	33
2.1.3 <i>De la fertilisation à la formation du blastocyste</i>	34
2.2 <i>La fenêtre implantatoire</i>	35
2.2.1 <i>L'apposition</i>	36
2.2.2 <i>L'adhésion, début de pénétration</i>	37
2.2.3 <i>L'invasion</i>	37
2.3 <i>Le placenta chorio-allantoïdien chez la souris</i>	37
2.3.1 <i>Différenciation des cellules trophoblastiques</i>	38
2.3.2 <i>Développement placentaire et morphogenèse</i>	39
2.3.3 <i>Expression des protéases et des facteurs angiogéniques par les cellules trophoblastiques</i>	40
2.3.3.1 Les protéases.....	40
2.3.3.2 Les facteurs pro- et anti-angiogènes.....	43
3. METALLOPROTEASES ET SYSTEME PLASMINOGENE/PLASMINE : ACTEURS AU COURS DE LA REPRODUCTION.....	44
3.1 <i>Les métalloprotéases (MMPs)</i>	44
3.1.1 <i>Structure et classification des MMPs</i>	44
3.1.2 <i>Régulation de l'activité des MMPs</i>	46
3.1.2.1 Régulation transcriptionnelle.....	46
3.1.2.2 Régulation de l'activation.....	47
3.1.2.3 Inhibition des MMPs actives.....	48
3.1.3 <i>MMPs et endomètre humain</i>	49
3.1.3.1 Expression et origine des MMPs dans l'endomètre humain.....	49
3.1.3.2 Régulation de l'expression des MMPs au niveau de l'endomètre humain.....	51
3.2 <i>Le système plasminogène/plasmine</i>	52
3.2.1 <i>La plasmine</i>	52
3.2.1.1 Les activateurs du plasminogène.....	53
3.2.2 <i>Les inhibiteurs du système plasminogène/plasmine</i>	54
3.2.2.1 Les inhibiteurs des activateurs du plasminogène (PAIs).....	54
3.2.2.2 L'alpha2-antiplasmine.....	58
3.2.3 <i>Contribution du système plasminogène/plasmine dans la reproduction</i>	59

Table des matières

3.2.3.1 Expression et rôle des composants du système plasminogène/plasmine au niveau de l'endomètre.....	59
3.2.3.2 Expression et rôle des composants du système plasminogène/plasmine lors de la placentation.....	59
III-BUT ET PLAN DU TRAVAIL	63
IV-RESULTATS	65
Chapitre 1. LA PLACENTATION CHEZ LES SOURIS DEFICIENTES POUR PAI-1.....	65
Chapitre 2. LES EFFETS BIOLOGIQUES DU TRAITEMENT LOCAL DE L'ENDOMETRE PAR UN PROGESTATIF (LE LEVONORGESTREL).....	81
2.1 <i>Impact du levonorgestrel sur la vascularisation endométriale en fonction du temps d'exposition</i>	82
2.2 <i>Impact du Levonorgestrel sur l'expression des métalloprotéases</i>	93
V-CONCLUSIONS ET DISCUSSION	105
VI-PERSPECTIVES	112
VII-BIBLIOGRAPHIE	113

I-Avant propos

La **reproduction** définit l'ensemble des processus par lesquels une espèce se perpétue en engendrant de nouveaux individus. C'est une des activités fondamentales partagées par tous les êtres vivants. Au cours de ce processus, une série d'évènements se met en place depuis la préparation de l'appareil reproducteur jusqu'à la naissance d'un nouvel individu. Chez les mammifères, la reproduction est orchestrée par les hormones qui préparent l'**utérus**, essentiellement l'**endomètre** qui subit des modifications cycliques en préparation à la réception d'un œuf fécondé. Une fois l'œuf implanté, une circulation sanguine fœtale et maternelle s'établit au niveau du **placenta** afin d'apporter à l'embryon puis au fœtus les nutriments et l'oxygène nécessaires à son développement. Le système circulatoire fœtal permet par ailleurs, l'évacuation des déchets gazeux (CO₂) et métaboliques (urée). Une **circulation sanguine** adéquate et appropriée s'avère donc indispensable afin d'assurer un bon déroulement de la **gestation**.

L'implantation et le développement embryonnaires est la première étape au cours de la croissance nécessitant l'activation du système endothélial. Durant cette étape, le réseau vasculaire se constitue *via* deux mécanismes : la **vasculogénèse** et l'**angiogénèse**. La vasculogénèse consiste en la formation du plexus capillaire primaire par la différenciation de cellules précurseurs mésodermiques en cellules endothéliales. Ensuite, l'**angiogénèse** permet la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir des vaisseaux préexistants par bourgeonnement ou intussusception.

Un équilibre adéquat entre les facteurs pro-angiogènes (*Vascular Endothelial Growth Factor* "VEGF", Fibroblast Growth Factor "FGF" ...) et anti-angiogènes (endostatine, angiostatine,...) est indispensable à l'établissement d'un réseau vasculaire correct et fonctionnel. Parmi les facteurs angiogènes, on retrouve des facteurs de croissance, des cytokines et des **protéases**. Ces facteurs peuvent moduler la prolifération et la migration des cellules endothéliales, mais également jouer un rôle dans le remodelage de la matrice extracellulaire indispensable au développement vasculaire.

Le remodelage de la matrice extracellulaire est coordonné par les protéases matricielles, telles que les **protéases à sérine** et les **métalloprotéases matricielles (MMPs)** qui représentent les deux familles les plus importantes.

Hormis leurs effets sur l'angiogénèse, les MMPs interviennent également à d'autres stades de la reproduction. Elles contribuent en grande partie au remodelage subi par l'endomètre durant le cycle menstruel. En effet, si durant le cycle une fécondation est établie, ces protéases participent dans un premier temps à la dégradation de l'épithélium

de surface de l'endomètre afin de permettre l'implantation du blastocyste. Dans un second temps, elles contribuent aux développements placentaire et embryonnaire. En l'absence de fécondation/implantation, les MMPs participent à l'élimination du tissu endométrial ayant subi une modification irréversible, à savoir la décidualisation, on parle alors des **menstruations**.

Le rôle important joué par les protéases dans plusieurs processus physiologiques (reproduction, cicatrisation et régénération tissulaire) n'exclut pas leurs contributions parfois primordiales dans divers pathologies, telles que la croissance tumorale et les métrorragies dysfonctionnelles.

Lors de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude des protéases et de l'angiogenèse au niveau de deux aspects distincts de la reproduction :

- 1) Une situation physiologique qu'est la placentation par le biais d'un modèle murin ;
Une situation pathologique chez les femmes souffrant de métrorragies dysfonctionnelles suite à l'utilisation d'un système intra-utérin à libération de progestatif comme moyen de contraception*
- 2) Une situation pathologique chez les femmes souffrant de métrorragies dysfonctionnelles suite à l'utilisation d'un système intra-utérin à libération de progestatif comme moyen de contraception*

.

II-Introduction

1. La reproduction humaine

L'utérus est le siège de la reproduction chez plusieurs espèces animales. Chez la femme, il s'agit d'un organe creux, impair et musculaire. L'utérus a pour fonction de constituer un environnement adéquat au développement de l'embryon puis du fœtus et de ses annexes (placenta, cordon ombilical et membranes).

La paroi utérine est composée de plusieurs couches tissulaires : (i) l'**endomètre** constitue la muqueuse en contact avec l'embryon ; (ii) la couche intermédiaire est un muscle lisse appelé **myomètre**; (iii) l'**adventice** est la couche la plus extérieure recouverte par le péritoine.

1.1 Physiologie de l'endomètre

L'endomètre est constitué de deux compartiments tissulaires principaux : (1) un compartiment épithélial formant les épithélia de surface et glandulaire ; (2) un compartiment stromal composé majoritairement de fibroblastes mais aussi de cellules endothéliales, de macrophages et de lymphocytes T périvasculaires. Pendant la phase sécrétoire (voir paragraphe 1.2, Le cycle menstruel), on observe également une population abondante de cellules «natural killer (NK)».

La muqueuse utérine, fortement vascularisée et riche en glandes, subit des modifications tissulaires cycliques importantes, rythmées par l'axe hypothalamo-hypophysaire (Figure 1). Ces variations cycliques subies par l'endomètre, généralement tous les 28 jours, se font en préparation à une éventuelle nidation d'un œuf fécondé. Ainsi, s'il y a fécondation, l'œuf s'implante dans l'endomètre pour entamer la grossesse. Dans le cas contraire, l'endomètre est éliminé au cours des menstruations, qui marquent le début d'un nouveau cycle. Ce dynamisme tissulaire « unique de l'endomètre » est orchestré par des taux variés d'hormones stéroïdiennes : l'œstradiol et la progestérone (Figure 1).

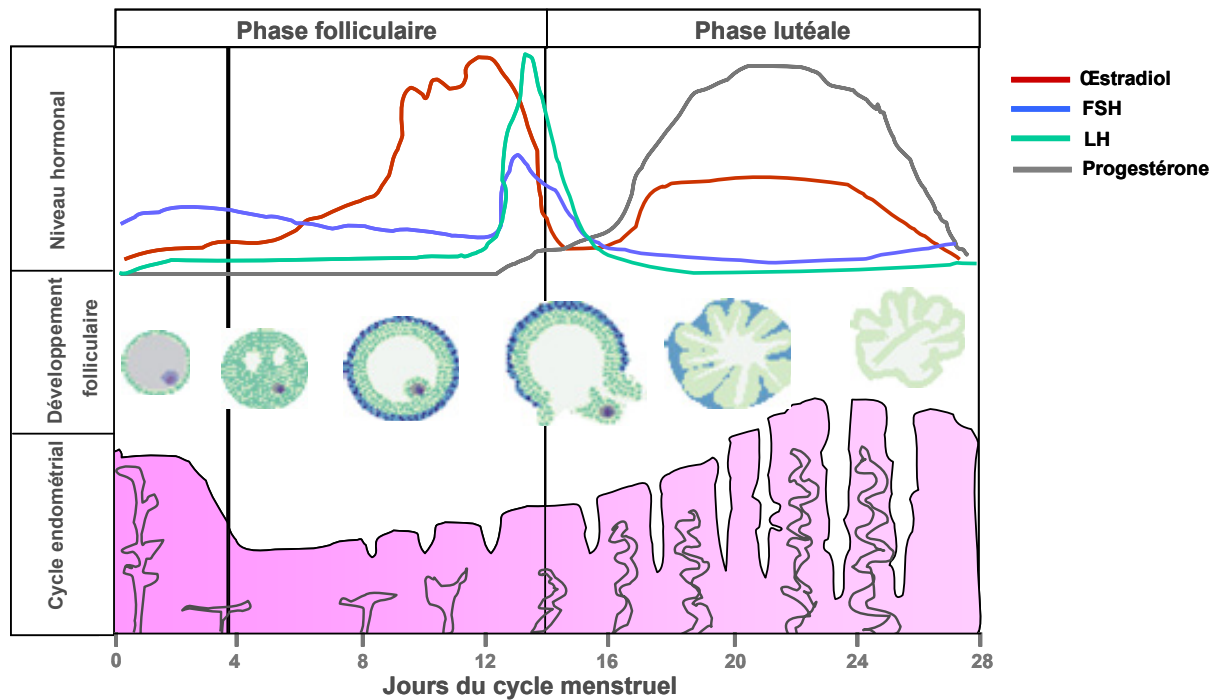


Figure 1 : Variation de l'aspect de la muqueuse utérine, des concentrations des gonadotrophines hypophysaires et des stéroïdes ovariens au cours des phases du cycle menstruel. FSH : Follicle Stimulating Hormone, LH : Luteinizing Hormone.

1.1.1 Les hormones stéroïdiennes et leurs récepteurs

Les hormones sexuelles d'origine gonadique sont des stéroïdes dérivant du cholestérol. On y distingue (1) les androgènes dont la molécule type est la testostérone; (2) les progestogènes dont la molécule type est la progestérone; et (3) les œstrogènes dont la molécule type est l'œstradiol. La petite taille (± 300 daltons) et la liposolubilité des hormones stéroïdiennes leur sont indispensables afin de pouvoir circuler librement dans les cellules cibles et par conséquent atteindre leurs récepteurs intracellulaires. Dans la circulation sanguine, ces hormones se lient à des protéines comme l'albumine ou la SHBG (Sex Hormone Binding Globulin).

1.1.1.1 L'œstrogène et ses récepteurs (ER, estrogen receptor)

Les effets biologiques des œstrogènes s'observent essentiellement au niveau de la reproduction féminine (tractus reproducteur et développement mammaire). Cependant, il a aussi été démontré que les œstrogènes jouent un rôle au niveau de la reproduction chez l'homme. De plus, les œstrogènes semblent agir sur des tissus autres que le système reproducteur, comme, par exemple, les systèmes nerveux central, cardio-vasculaire et osseux. Les œstrogènes sont produits majoritairement lors du développement folliculaire par les cellules de la thèque interne et de la granulosa.

L'œstradiol est responsable de l'induction de l'expression de plusieurs gènes clés au niveau de l'endomètre comme le récepteur à la progestérone (PR) et le vascular endothelial growth factor (VEGF) (Chauchereau *et al*, 1992; Meduri *et al*, 2000). Les œstrogènes sont également produits en petites quantités par d'autres tissus, tels le foie, les glandes surrénales, les glandes mammaires et le tissu adipeux. Ces sources secondaires d'œstrogènes sont particulièrement importantes après l'épuisement du stock folliculaire chez les femmes ménopausées.

Les œstrogènes circulent de façon systémique et exercent des effets sélectifs en fonction du tissu cible via leurs récepteurs. Les ER sont exprimés sous deux isoformes : ER α et ER β . ER α a été cloné en 1986 à partir de la lignée cellulaire de cancer du sein (MCF-7) (Greene *et al*, 1986). L'ER β a été cloné à partir de la prostate du rat (Kuiper *et al*, 1996). Ces deux récepteurs présentent une structure générale, commune aux récepteurs des hormones stéroïdiennes, basée sur 6 domaines (A→F). Le domaine N-terminal **A/B** comprend le site AF-1 (activation fonction-1) et représente le site d'interaction avec des facteurs de transcription. Le domaine **C** est le domaine de liaison à l'ADN comprenant deux doigts de Zinc, alors que les domaines **D**, **E** et **F** forment le site de liaison du ligand. Le domaine **E** porte également le site AF-2 capable d'interagir avec différents co-activateurs (Figure 2).

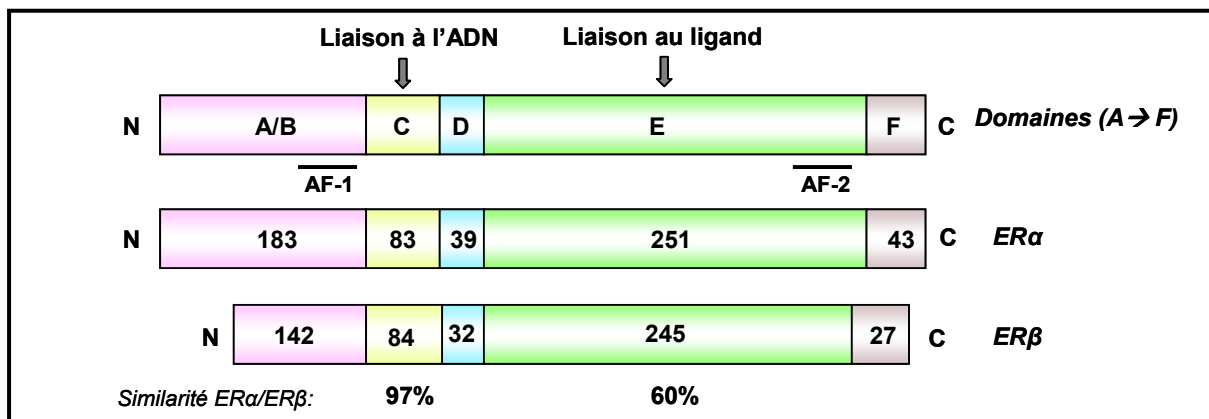


Figure 2 : Schéma des domaines structuraux des récepteurs à l'œstrogène (ER α et ER β). Le nombre d'acides aminés des différents domaines et la fonction associée à chaque domaine sont indiqués. AF-1 et AF-2 indiquent les régions par lesquelles sont médiées les fonctions d'activation transcriptionnelle de ER. Le degré de similarité entre ER α et ER β au niveau du domaine C et du domaine E est indiqué en-dessous de ces derniers. ER α est composé de 599 AA, et ER β de 530 AA. D'après (Hewitt *et al*, 2005).

Grâce à la génération de souris déficientes pour le ou les récepteurs aux œstrogènes (ER α et/ou ER β), plusieurs équipes ont étudié le rôle joué par les œstrogènes. Le tableau 1 résume l'essentiel des effets observés chez les souris déficientes (KO, Knock Out) pour les gènes codant les ERs.

L'essentiel des effets des œstrogènes, observé au niveau de la reproduction semble être médié par l'isoforme α du récepteur.

Tissu	ERα^{-/-}	ERβ^{-/-}	ER α/β^{-/-}
Glandes mammaires	Immatures	Structure et lactation Normales	Immatures
Fertilité	Mâles et femelles infertiles	Mâles fertiles	Mâles et femelles infertiles
Hypophyse	Taux élevés de LH Taux réduits de prolactine	Normale	Taux élevés de LH
Ovaires	Taux d'œstrogène et de testostérone élevés Follicules non matures, kystiques et hémorragiques dus aux taux élevés de LH	Réduction du nombre de corps jaunes et de super-ovulation Gonadotrophines et stéroïdes normaux	Dégénérescence progressive des cellules germinales. Réduction des cellules de la granulosa. Taux élevé de LH, d'œstrogène et de testostérone
Utérus : réponse aux œstrogènes	Immature et insensible aux œstrogènes. Pas de prolifération épithéliale et d'induction de gènes œstrogéno-dépendants	Réponse normale aux œstrogènes	Insensible aux œstrogènes
Utérus : implantation	Pas d'implantation	Les souris sont gestantes et arrivent à terme	Non testé
Testicules	Dilatation des tubes séminifères et perte éventuelle de sperme	Normaux	Dilatation des tubes séminifères et perte éventuelle de sperme

Tableau 1 : Phénotypes observés après une délétion des ER α , ER β et ER α/β chez la souris. D'après (Hewitt & Korach, 2002).

1.1.1.2 La progestérone et ses récepteurs (PR, progesterone receptor)

La progestérone est la seconde hormone stéroïdienne essentielle à la transformation de l'endomètre préalablement imprégné d'œstrogènes en préparation à l'implantation. Chez la femme, la progestérone est exprimée en plus grande quantité à partir du 14^{ème} jour du cycle par les cellules de la granulosa du corps jaune. S'il n'y a pas de fécondation, la concentration de progestérone revient à un niveau normal en fin de cycle. En cas de fécondation, l'hormone gonadotrophine chorionique (hCG) produite par l'œuf, maintient l'activité du corps jaune dès le 10^{ème} jour de grossesse. Une fois que le corps jaune cyclique est transformé en corps jaune gravidique sous l'effet de l'hCG, ce corps jaune va assurer la sécrétion des œstrogènes et de la progestérone nécessaire à l'évolution de la

grossesse jusqu'à la 7^{ème} semaine d'aménorrhée. Par la suite, c'est le placenta qui assurera cette activité hormonale sécrétoire jusqu'à la fin de la grossesse.

Le récepteur à la progestérone (PR) appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires. Il est le membre le mieux caractérisé à ce jour et est unique de par son importante taille de 933 acides aminés. Comme le récepteur aux œstrogènes, le récepteur à la progestérone peut se présenter sous 2 isoformes : PR-A et PR-B. A l'inverse des ER, les 2 isoformes du PR sont codées par un même gène mais sont sous le contrôle de deux promoteurs distincts (Kraus *et al*, 1993).

PR-A et PR-B présentent une forte similarité de structure avec pour unique différence une séquence N-terminale plus longue de 164 AA pour le récepteur PR-B. Cette région porte le site AF-3 spécifique de l'isoforme B (Sartorius *et al*, 1994). Les PR comprennent 4 domaines : le domaine N-Terminal (NTD, N-Terminal Domain), un domaine de liaison à l'ADN (DBD, DNA Binding Domain) composé de deux doigts de Zn afin de faciliter la liaison aux éléments de réponse à l'ADN, une région charnière (H, hinge) et un domaine de liaison au ligand (LBD, Ligand Binding Domain) contenant un sous domaine intervenant dans la dimérisation du récepteur (Figure 3).

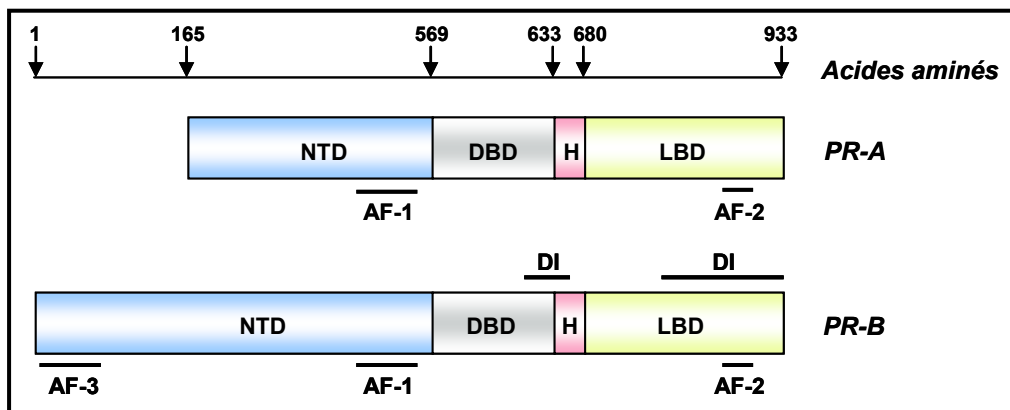


Figure 3 : Schéma des domaines structurels des récepteurs à la progestérone. NTD: N-terminal domain, DBD: DNA binding domain; H: region charnière ; LBD: ligand binding domain; DI: domaine de dimérisation; AF-1, AF-2 et AF-3 : domaines d'activation de la transcription. Modifié d'après (Oehler *et al*, 2000).

L'utilisation de souris déficientes pour le PR-A, et/ou le PR-B a permis de mettre en évidence le rôle qu'ils jouent au niveau de la reproduction (Tableau 2). Néanmoins, la présence de PR s'est révélée essentielle dans d'autres tissus comme dans l'inhibition de l'évolution thymique au cours de la gestation (Tibbetts *et al*, 1999) ainsi que par son effet antiprolifératif sur des cellules endothéliales en culture (Vazquez *et al*, 1999).

Tissu	PR A^{-/-}	PR B^{-/-}	PR A/B^{-/-}
Ovaires	Absence d'ovulation	Ovulation normale	Absence d'ovulation
Fertilité	Infertiles	Fertiles	Mâles fertiles et femelles infertiles
Glandes mammaires	Absence de développement des glandes mammaires	Réduction du branchement et du développement lobulo-alvéolaire	Absence de développement des glandes mammaires
Utérus	Absence de décidualisation et d'implantation	Décidualisation et implantation normales	Absence de décidualisation et d'implantation

Tableau 2 : Phénotypes observés après une délétion des PR-A, PR-B et PR-AB chez la souris. D'après (Lydon *et al*, 1995) et (Mulac-Jericevic & Conneely, 2004)

L'expression des PR a également été observée dans divers tissus, notamment au niveau cérébral, pulmonaire et cardiovasculaire. Dans l'endomètre, l'expression de PR a été identifiée dans les cellules stromales et les cellules de l'épithélium glandulaire. Cependant, son expression par les cellules endothéliales dans l'endomètre n'a été démontrée qu'au niveau de l'ARNm (Krikun *et al*, 2005) et non au niveau protéique (Perrot-Applanat *et al*, 1988).

Les PR-A et PR-B ont des rôles de transactivateurs différents en fonction du type cellulaire où ils sont exprimés et du gène cible. Néanmoins, PR-B est décrit comme activateur de la transcription de plusieurs promoteurs PR-dépendants quand PR-A est inactif. Quand PR-A et PR-B sont tous les deux exprimés en culture, PR-A est capable de réprimer l'expression de PR-B (Giangrande & McDonnell, 1999).

Plusieurs études ont montré l'existence d'un troisième récepteur à la progestérone nommé PR-C (45-50kDa). Il est exprimé par l'utérus de la rate (Ogle *et al*, 1997) et par les cellules cancéreuses du sein T47D (Wei *et al*, 1990). Le PR-C peut former des homodimères mais aussi des hétérodimères avec PR-A ou PR-B, cependant son rôle exact n'est pas encore bien établi.

1.1.1.3 Mécanisme d'action des récepteurs stéroïdiens

La liaison des récepteurs stéroïdiens à leurs ligands induit un changement de conformation de la protéine induisant, d'une part, la dissociation des récepteurs de leurs protéines inhibitrices comme les heat shock proteins (hsp) et, d'autre part, la dimérisation des récepteurs. Des homodimères (ER α /ER α , ER β /ER β ou PR-A/PR-A, PR-B/PR-B) ou des hétérodimères (ER α /ER β ou PR-A/ PR-B) peuvent se former.

Une fois le dimère formé, sa phosphorylation est induite et conduit à une translocation nucléaire du dimère permettant l'accès des récepteurs à des éléments de réponse aux œstrogènes (ERE, Estrogen Response Element) ou des éléments de réponse à la progestérone (PRE, progesterone Response Element) localisés au niveau du promoteur du gène cible. L'interaction de ce complexe avec des coactivateurs et des facteurs de transcription généraux produit un complexe initiateur de transcription qui va moduler l'expression d'ARNm dont la traduction mènera à l'effet final de l'hormone (Figure 4).

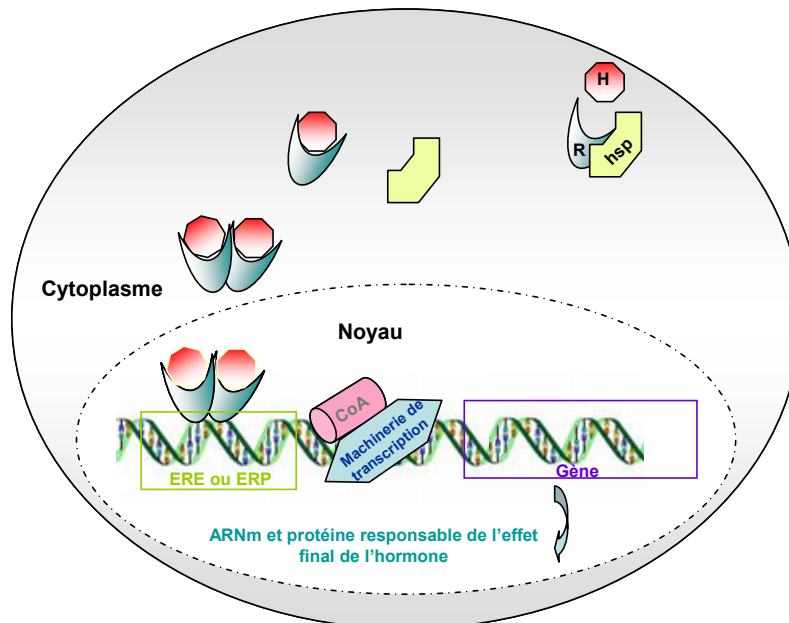


Figure 4 : Mécanisme d'action des récepteurs aux hormones stéroïdiennes. Coa : Coactivateur; ERE: élément de réponse aux œstrogènes ; ERP: élément de réponse à la progestérone ; H: hormone (œstrogène ou progestérone) ; hsp: heat shock protein ; R:récepteur.

1.2 Le cycle menstruel

Le cycle menstruel est divisé en 3 phases successives, chacune caractérisée par des modifications morphologiques de l'endomètre et orchestrée par les variations hormonales (Noyes *et al*, 1975). (1) Une première phase pré-ovulatoire, œstrogène dominante, qui va conduire l'endomètre à proliférer, (2) une deuxième phase post-ovulatoire, progestérone dominante, qui va transformer l'endomètre prolifératif en un tissu sécrétoire et (3) une troisième phase, constituée des menstruations, qui accompagne la chute hormonale en fin du cycle.

1.2.1 La phase folliculaire

La phase folliculaire, dite aussi phase proliférative, se prolonge du 6^{ème} au 14^{ème} jour du cycle. Au cours de cette phase, l'endomètre va se reconstituer sous l'induction du taux d'œstrogènes élevé dans le sang. Il se forme à l'intérieur de l'utérus une nouvelle couche qui va s'enrichir de glandes en croissance continue et d'artères prenant la forme de petits ressorts (artères spiralées). L'expression des ERs est maximale dans les noyaux des cellules épithéliales et stromales durant cette phase, puis diminue progressivement pendant la phase sécrétoire (Snijders *et al*, 1992; Fujishita *et al*, 1997). Néanmoins, le taux d'ARNm de ER β reste prédominant dans les cellules épithéliales glandulaires (Matsuzaki *et al*, 1999). Au niveau des cellules endothéliales, qu'il s'agisse de capillaires, de veines ou d'artérioles, seul le ER β est exprimé (Lecce *et al*, 2001; Critchley *et al*, 2001). PR-A et PR-B présentent le même profil d'expression que celui des ERs, c'est-à-dire une forte expression glandulaire et stromale durant la phase folliculaire et une diminution pendant la phase sécrétoire.

1.2.2 La phase lutéale

La phase lutéale, dite aussi phase sécrétoire, se prolonge du 15^{ème} au 28^{ème} jour du cycle, et permet la préparation de l'utérus à l'implantation de l'ovule fécondé. La première partie de cette phase débute sous l'action des œstrogènes et de la progestérone. Les glandes deviennent plus profondes et plus sinueuses et la spiralisation des artérioles s'accroît. La progestérone va provoquer la synthèse et le stockage du glycogène dans le pôle basal des cellules, provoquant ainsi le refoulement des noyaux vers le pôle apical. A partir du 22^{ème} jour du cycle, les glandes deviennent très contournées (en dents de scie), le glycogène gagne le pôle apical et est excrété hors de la cellule, les artérioles atteignent leur spiralisation maximale et le stroma devient œdémateux. L'expression des ERs et, principalement celle des PR au niveau glandulaire, diminue considérablement pendant cette phase du cycle (Fujishita *et al*, 1997). Une étude analysant l'expression des PR-A et PR-B montre qu'au niveau stromal l'isoforme A du récepteur à la progestérone est la forme dominante durant cette phase du cycle (Wang *et al*, 1998).

En fin de phase sécrétoire, la décidualisation du stroma débute en périphérie des artères spiralées et s'étend de manière centrifuge à l'entièreté du stroma. Ces modifications morphologiques sont associées à des modifications fonctionnelles :

- Au milieu de la phase sécrétoire, l'endomètre devient temporairement réceptif à l'implantation du blastocyste, on parle de « fenêtre d'implantation ». Cette période est caractérisée par l'expression de plusieurs facteurs, notamment des cytokines comme le LIF-1 (Leukemia Inhibitory Factor-1), l'IL-6 (Interleukine-6) et l'IL-11, mais aussi de plusieurs intégrines (Stewart *et al*, 1992; Lessey, 1997; Bilinski *et al*, 1998).
- A la fin de la phase sécrétoire, la décidualisation signe la fin de la fenêtre d'implantation. La décidualisation est caractérisée par : (1) une transition mésenchymo-épithéliale des cellules stromales; (2) des modifications de la matrice extracellulaire; (3) la sécrétion de facteurs spécifiques comme la prolactine, l'IGFBP-1 (Insulin Growth Factor Binding Protein-1); des prostaglandines et plusieurs cytokines; et (4) l'invasion par des cellules NK présentant un phénotype spécifiquement décidual (CD56⁺, CD16⁻), contrairement aux NK systémiques qui sont CD56⁺ et CD16⁺.

1.2.3 La phase menstruelle

Le terme *menstruation* tient son origine du mot latin *mensis* (mois) qui évoque les cycles lunaires mensuels. Cette phase est initiée par la chute du taux circulant de progestérone. Des études sur le singe Rhésus ont montré que les menstruations peuvent être inhibées par l'administration de progestérone durant les 36 premières heures qui suivent la chute hormonale. Au-delà des 36 heures, l'apport d'hormones est incapable d'empêcher l'apparition des menstruations (Brenner *et al*, 2002). Ainsi, la phase menstruelle peut être divisée en deux sous phases : une réversible et une irréversible. Il est connu qu'à la fin de la phase sécrétoire, l'abondance des PR diminue de façon dramatique au sein des cellules stromales et épithéliales. Néanmoins, le stroma périvasculaire et les myofibroblastes entourant les vaisseaux sanguins continuent à exprimer les PR (Perrot-Applanat *et al*, 1994). Ainsi, les menstruations sont initiées par la chute hormonale au niveau du stroma périvasculaire, toujours sensible aux variations hormonales.

Dans un premier temps, les effets engendrés par la chute hormonale sont une vasoconstriction (Markee, 1978) et un changement de la concentration des cytokines. Plusieurs candidats pourraient jouer un rôle dans la vasoconstriction des artères spiralées conduisant l'endomètre à un état d'hypoxie. En effet, il a été démontré que les prostaglandines jouent un rôle important à ce niveau et leur concentration augmente significativement au moment des menstruations (Downie *et al*, 1974). De plus, la cyclo-

oxygénase 2 (COX-2), qui joue un rôle dans la biosynthèse des prostaglandines d'indice 2 à partir de l'acide arachidonique, voit son activité inhibée par la progestérone alors que l'activité des prostaglandines déshydrogénases (PGDH) augmente et maintient les prostaglandines à l'état inactif.

Dans un second temps, des phénomènes irréversibles se mettent en place sous l'action des cytokines et des enzymes matricielles, telles que les métalloprotéases (MMPs). Le rôle de ces enzymes dans la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) lors des menstruations est largement documenté.

La diminution drastique du taux de progestérone provoque la stimulation de l'expression de plusieurs chémokines (polypeptides pro-inflammatoires), telles que l'IL-8 exprimée par les cellules de l'épithélium de surface et glandulaire (Arici *et al*, 1998), l'éotaxine exprimée par l'épithélium et les cellules déciduales (Zhang *et al*, 2000b), MCP-1 et MCP-2 (Monocyte Chemoattractant Protein) et RANTES (Regulated Upon Activation Normal T Cell Expressed and Secreted). Ces chémokines attirent et activent les leucocytes au niveau du tissu cible, ce qui entraîne (Figure 5) :

- La production accrue de protéases par les cellules inflammatoires (Tableau 3). Ces enzymes ont un effet direct sur les composants de la MEC et ceux des membranes basales des vaisseaux sanguins, mais aussi sur l'activation d'autres MMPs, telles que la MT1-MMP connue pour réguler l'activation de la MMP-2 (Zhang *et al*, 2000a);
- La sécrétion d'autres enzymes comme la tryptase des mastocytes. Cette protéase particulière contribue à la cascade d'activation des MMPs, notamment par le clivage de la pro-MMP-3 (Salamonsen & Lathbury, 2000);
- La sécrétion de cytokines, telles que l'IL-1 et le TNF α (Tumor Necrosis Factor α) qui vont à leur tour stimuler la production de la MMP-1 et de la MMP-3 par les cellules stromales (Rawdanowicz *et al*, 1994; Zhang *et al*, 1998; Pretto *et al*, 2008) .

La régulation des cytokines est médiée par la voie du NF κ B (nuclear factor-kappa B), facteur de transcription responsable de l'activation de l'expression de plusieurs gènes participant à l'inflammation. Au cours du cycle menstruel, la progestérone inhibe cette voie *via* des inhibiteurs endogènes, les I κ B (Inhibitor of NF κ B) (Baldwin, Jr., 1996). La chute hormonale en fin de cycle provoque donc l'activation de la voie du NF κ B et l'expression des cytokines sous sa dépendance.

Type cellulaire	Protéases sécrétées
Mastocytes	Tryptase, chymase, hymotrypsin
Neutrophiles	Elastase, MMP-8, MMP-9, MT1-MMP, cathepsin D
Eosinophiles	MMP-1, MMP-9
Macrophages	MMP-9, métalloélastase, MT1-MMP
Lymphocytes T	MMP-2, MMP-9
Natural Killer	MT1-MMP

Tableau 3 : Liste non exhaustive des protéases sécrétées par les différentes cellules inflammatoires au cours des menstruations (Salamonsen *et al*, 2002).

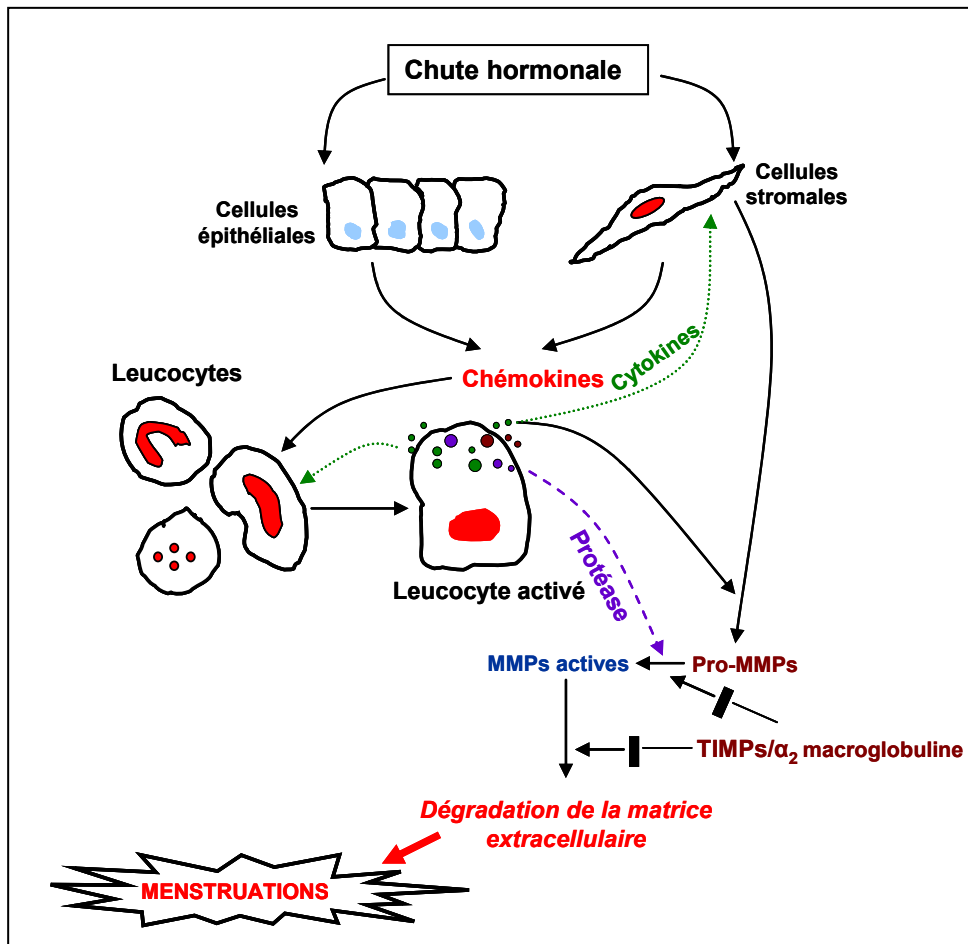


Figure 5 : Contribution des cellules inflammatoires et des molécules associées aux menstruations.

Le recrutement et l'activation des leucocytes conduisent essentiellement à l'expression et à l'activation des MMPs qui vont dégrader la matrice extracellulaire associée aux menstruations. Les MMPs sont inhibées par leurs inhibiteurs physiologiques, les TIMPs (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases) et par l' α_2 macroglobuline. Modifié d'après Salamonsen (Salamonsen, 2003).

1.3 L'angiogenèse

La formation de nouveaux vaisseaux sanguins, appelée néovascularisation, est essentielle pour la croissance de l'organisme et son homéostasie. Ce processus implique la migration et la différenciation de cellules endothéliales et périvasculaires (péricytes et cellules musculaires lisses), dont le résultat final est la morphogenèse d'un arbre vasculaire complexe et multifonctionnel. Au cours de l'embryogenèse, tout comme chez l'adulte, les nouveaux vaisseaux prennent naissance initialement sous la forme de simples tubes de cellules endothéliales. Certains deviennent ensuite des capillaires après différenciation et apposition de péricytes ; d'autres se transforment en vaisseaux de plus grands calibres (artères, veines) après la mise en place d'une paroi constituée de plusieurs couches de cellules musculaires lisses. La néovascularisation est orchestrée par un équilibre entre des facteurs pro-angiogéniques et des facteurs anti-angiogéniques.

1.3.1 Les types de néovascularisation

La néovascularisation peut être répartie en 3 catégories : la vasculogenèse, l'angiogenèse et la lymphangiogenèse.

1.3.1.1 La vasculogenèse

Au cours du développement embryonnaire, la formation du système cardiovasculaire débute par la vasculogenèse, processus qui donne naissance à un réseau primitif de structures vasculaires. Les cellules endothéliales se différencient *in situ* à partir de précurseurs, les angioblastes, eux-mêmes dérivés de cellules souches plus primitives, les hémangioblastes (Risau & Flamme, 1995; Carmeliet, 2004).

1.3.1.2 L'angiogenèse

L'angiogenèse proprement dite se définit comme la formation de nouveaux capillaires à partir de vaisseaux préexistants. Ce processus intervient, d'une part, au cours de la vie embryonnaire permettant la constitution d'un réseau vasculaire mature, et d'autre part, au cours de la vie adulte lors de la néovascularisation.

L'angiogenèse s'observe physiologiquement lors du remodelage tissulaire lié au système génital féminin (cycle menstruel, placentation et développement des glandes mammaires), et aussi au niveau de la réparation tissulaire (la cicatrisation). Ce processus de développement vasculaire s'effectue par deux principaux processus distincts :

(a) L'angiogenèse bourgeonnante, qui se caractérise par une succession de 4 étapes principales (Figure 6) :

- **Le bourgeonnement** correspond à la formation d'une masse cellulaire endothéliale à la surface externe des capillaires et des veinules et appelée bourgeons endothéliaux. Ces bourgeons sont pleins puis se creusent d'une lumière.
- **La migration** consiste en l'allongement des bourgeons endothéliaux vers les stimuli angiogéniques. Cette migration des cellules endothéliales activées implique que celles-ci perdent leurs jonctions avec les cellules endothéliales voisines et avec les cellules périendothéliales de soutien et qu'elles acquièrent de nouvelles propriétés, telles que : (1) la capacité de dégrader localement la membrane basale vasculaire grâce à l'expression de protéases, comme les activateurs du plasminogène et les métalloprotéases matricielles; (2) l'expression à leur surface de nouveaux récepteurs de la matrice extracellulaire. Les plus caractéristiques sont les intégrines $\alpha_V\beta_3$ et $\alpha_V\beta_5$, non exprimées par les cellules endothéliales quiescentes et induites à la surface des cellules endothéliales activées (Eliceiri & Cheresh, 1999).
- **La différenciation** au cours de laquelle, les capillaires néoformés s'anastomosent les uns aux autres et acquièrent leur architecture fonctionnelle.
- **La maturation et la stabilisation** représentent les étapes finales de la formation de néovaisseaux. En effet, les vaisseaux néoformés sont stabilisés par le recrutement de cellules périvasculaires.

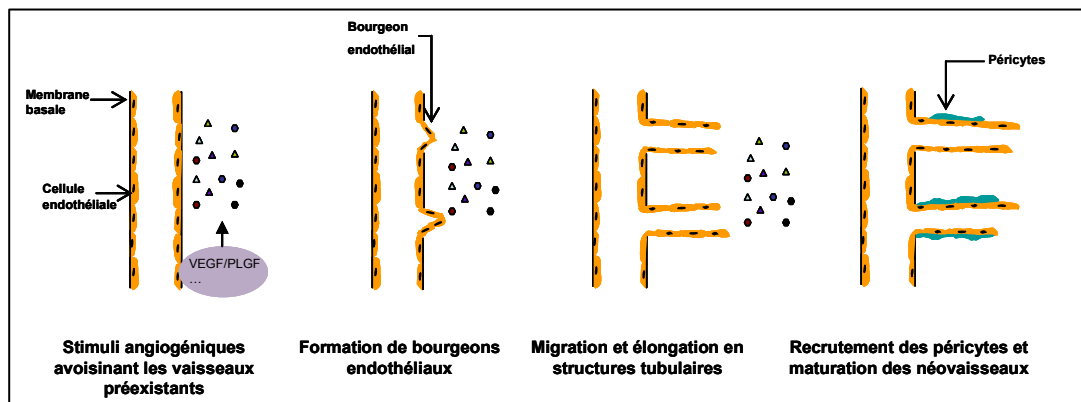


Figure 6 : Les différentes étapes de l'angiogenèse bourgeonnante.

Sous l'effet de facteurs angiogéniques (VEGF, FGF, PLGF...), des bourgeons endothéliaux se forment et les cellules endothéliales activées migrent et se prolongent pour former des structures tubulaires qui seront par la suite stabilisées grâce au recrutement de péricytes.

(b) L'intussusception : consiste en la séparation longitudinale d'un vaisseau en deux vaisseaux de plus petit calibre, soit par la formation de ponts entre les cellules endothéliales, soit par l'insertion d'une colonne de tissu interstitiel dans la lumière du vaisseau (Figure 7). Cette forme d'angiogenèse fait appel non seulement aux cellules endothéliales mais surtout à des cellules périvasculaires pour le dépôt de matrice formant

la paroi séparant les deux parties du vaisseau. Ce processus requiert peu la prolifération cellulaire mais plutôt le réarrangement et le remodelage des structures existantes.

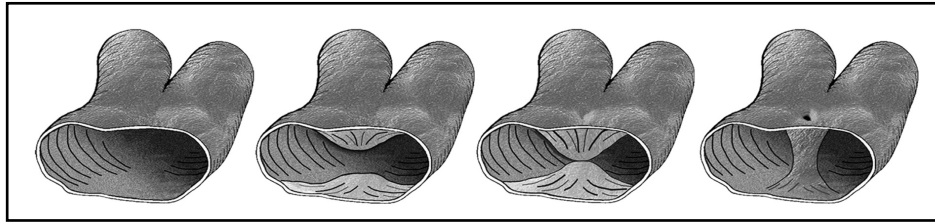


Figure 7 : Angiogenèse non bourgeonnante ou intussusception : formation de deux vaisseaux de plus petits calibres suite à une division longitudinale d'un vaisseau préexistant

1.3.1.3 La lymphangiogenèse

La lymphangiogenèse permet le développement de vaisseaux lymphatiques à partir de cellules précurseurs, les lymphangioblastes, ou par transdifférenciation à partir du réseau veineux (Karpanen & Alitalo, 2008).

1.3.2 Les régulateurs de l'angiogenèse

Les hormones stéroïdiennes régulent l'angiogenèse endométriale indirectement via des facteurs de croissance polypeptidiques (les cytokines), des molécules d'adhésion et des enzymes protéolytiques.

1.3.2.1 La famille du Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Le VEGF représente l'un des facteurs primordiaux jouant un rôle au cours de l'angiogenèse tant physiologique que pathologique. D'une part, il est reconnu pour son effet mitogène sur les cellules endothéliales, d'autre part, il accroît la perméabilité vasculaire.

Au sein de la famille du VEGF, on distingue différents membres : les VEGF-A, -B, -C, -D, -E et le PLGF (*Placenta-Like Growth Factor*). Le VEGF-A est le médiateur le plus important et le plus connu de l'angiogenèse (Hanahan & Folkman, 1996). Il comporte 4 isoformes principales, issues d'épissages alternatifs : le VEGF₁₂₁, le VEGF₁₆₅, le VEGF₁₈₉ et le VEGF₂₀₆. Les formes prédominantes dans la majorité des tissus, dont l'endomètre, sont les formes 121 et 165. Des isoformes plus rares ont également été décrites, les VEGF₁₄₅, ₁₈₃, ₁₆₂ et _{165b} (Ferrara, 2004). Ces isoformes sont soit sécrétées (VEGF₁₂₁), soit séquestrées dans la matrice extracellulaire grâce à leur affinité pour l'héparine (VEGF₁₈₉ et VEGF₂₀₆). Le VEGF₁₆₅, isoforme majeure, peut être soit sécrétée, soit liée à la surface cellulaire ou à la matrice extracellulaire.

Les effets biologiques du VEGF sont induits par leur interaction avec trois récepteurs de type tyrosine kinase (Figure 9). Le VEGF-R1, également appelé «*fms-like tyrosine kinase-1*» (FLT-1), et le VEGFR-2, ou «*fetal liver kinase-1*» (KDR/Flk-1), sont exprimés à la surface des cellules endothéliales et leur expression est augmentée notamment en condition d'hypoxie (Brogi *et al*, 1994). Le VEGF-R3, ou «*fms-like tyrosine kinase-4*» (FLT-4), est principalement exprimé au niveau de l'endothélium lymphatique et lie plus spécifiquement les VEGF-C et -D.

1.3.2.2 La famille du Fibroblast Growth Factor (FGF)

Cette famille est constituée d'une vingtaine de membres dont les plus connus sont : le FGF-1 (ou FGF acide, a-FGF) et le FGF-2 (ou FGF basique, b-FGF). Les FGF-1 et -2 sont synthétisés dans de nombreux tissus. Contrairement au VEGF dont l'activité mitogénique est spécifique des cellules endothéliales, les FGFs stimulent la prolifération de nombreux types cellulaires (cellules endothéliales, épithéliales, musculaires lisses ...) via 4 récepteurs (FGF-R1 à R4), mais seule l'expression des FGF-R1 et R2 a été mise en évidence au niveau des cellules endothéliales. Au niveau de l'endomètre, la source cellulaire du FGF-1 et -2 est essentiellement glandulaire et très peu stromale. Leur expression en fonction de la période du cycle varie selon les études. En effet, l'équipe de Ferriani a montré par immunohistochimie que l'expression de FGF-1 et FGF-2 ne varie pas au cours du cycle menstruel tandis que l'équipe de Möller confirme une augmentation de l'expression de FGF-2 pendant la phase proliférative (Ferriani *et al*, 1993; Moller *et al*, 2001). Une expression de FGF-2 a été aussi démontrée par les cellules endothéliales avec une augmentation pendant les menstruations et la phase proliférative (Moller *et al*, 2001). L'un des mécanismes d'action du FGF sur l'angiogenèse, hormis son effet mitogénique sur différents types cellulaires, est la stimulation de l'expression du VEGF-R2 (Pepper & Mandriota, 1998).

1.3.2.3 Les inhibiteurs de l'angiogenèse

L'établissement d'un réseau vasculaire en fonction des besoins de l'organisme est orchestré par une balance entre des facteurs pro-angiogènes et anti-angiogènes.

(a) *Les thrombospondines* (TSPs) font partie des facteurs anti-angiogéniques les plus documentés. Elles forment une famille de glycoprotéines qui sont soit sécrétées dans le sang, à partir des granules alpha des plaquettes, soit incorporées dans la matrice extracellulaire. La thrombospondine est constituée de trois monomères de glycoprotéines, chacun avec un poids de 180 kDa. Elles sont constituées de

plusieurs domaines responsables de différentes fonctions biologiques : adhésion, mouvement, prolifération cellulaire et régulation de l'angiogenèse. En effet, la TSP-1 inhibe la prolifération des cellules endothéliales (Bagavandoss & Wilks, 1990), déstabilise l'adhésion cellulaire (Murphy-Ullrich & Hook, 1989), ayant pour conséquence une inhibition de l'angiogenèse (Iruela-Arispe *et al*, 1991;Tolsma *et al*, 1993).

(b) Des fragments protéolytiques générés par le clivage enzymatique de composants de la matrice extracellulaire, d'enzymes impliquées dans le remodelage de la matrice ou d'une hormone, présentent des propriétés anti-angiogènes. Par exemple, la prolactine peut être clivée par la cathepsine D ou certaines MMPs pour donner naissance à un fragment de 16 kDa, capable d'inhiber l'action proliférative du VEGF et b-FGF (Clapp *et al*, 1993;Tabruyn *et al*, 2003;Piwnica *et al*, 2004;Macotela *et al*, 2006).

1.3.3 La maturation vasculaire

La maturation des vaisseaux naissants, formés par vasculogenèse ou angiogenèse, requiert le recrutement de cellules murales, une matrice extracellulaire de soutien, ainsi que la spécialisation du mur vasculaire par rapport à la régulation et la fonction vasculaires. Les cellules murales de soutien peuvent être des péricytes qui partagent la même membrane basale que les cellules endothéliales au niveau des capillaires ou des cellules musculaires lisses périvasculaires qui possèdent leur propre membrane basale au niveau des artérioles et des veinules (Figure 8).

Les cellules murales peuvent provenir de précurseurs mésenchymateux issus de la moelle osseuse (Lamagna & Bergers, 2006), ou se différencient à partir de cellules fibroblastiques et myofibroblastiques du stroma (Jain, 2003), ou même à partir de la transdifférenciation des cellules endothéliales. Les péricytes peuvent présenter une grande diversité de phénotypes intermédiaires entre ceux des cellules musculaires lisses et ceux des fibroblastes. Ils peuvent également exprimer des marqueurs immunohistochimiques variables en fonction du tissu, de l'espèce et de l'étape de développement (Gerhardt & Betsholtz, 2003). Le NG-2 et l'«Alpha Smooth Muscle Actin» (α -SMA) sont utilisés comme marqueurs péricytaire, mais aucun d'eux n'est parfaitement spécifique ni exprimé par tous les péricytes.

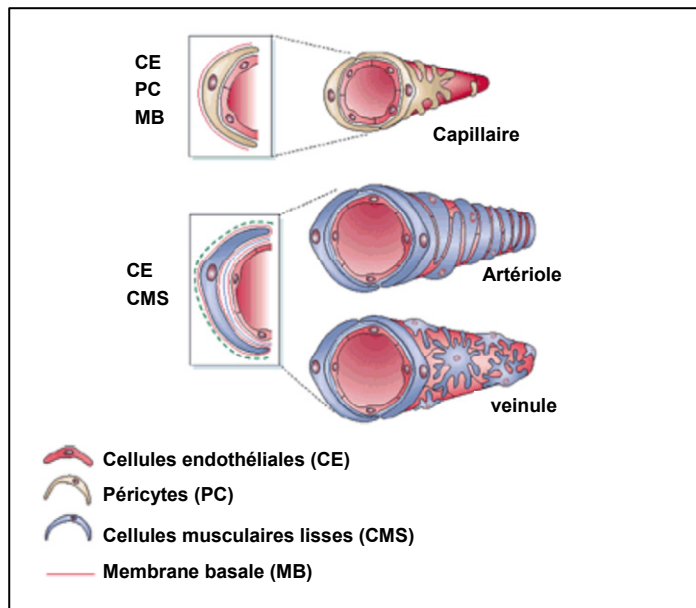


Figure 8 : Structure des vaisseaux sanguins matures. Les cellules endothéliales (CE) des vaisseaux sanguins sont recouvertes de cellules périvasculaires. Ces cellules sont, soit des péricytes qui se retrouvent préférentiellement au niveau des capillaires, soit des cellules musculaires lisses (CMS) qui se retrouvent préférentiellement autour des artérioles et des veinules. Modifié d'après (Jain, 2003)

Ces cellules sont en étroit contact avec les cellules endothéliales avec lesquelles elles partagent la même membrane basale. Cette interaction est réalisée via des médiateurs, tels que les angiopoïétines et le «*Platelet Derived Growth Factor-B*» (PDGF-B).

1.3.3.1 Le Platelet Derived Growth Factor (PDGF)

Le PDGF-B est l'un des 4 produits (PDGF-A, -B, -C et -D) des gènes de la famille des PDGFs. Les PDGFs se présentent sous formes d'homodimères ou d'hétérodimères et peuvent lier les récepteurs tyrosine kinases PDGFR- α et - β . La voie de signalisation PDGF-B/PDGFR- β joue un rôle très important dans le recrutement des péricytes au niveau des vaisseaux néoformés. Durant l'angiogenèse, les cellules endothéliales bourgeonnantes sécrètent du PDGF-B qui se lie à son tour au PDGFR- β exprimé par les cellules murales. Cette interaction stimule la prolifération et la migration des cellules périvasculaires durant la maturation vasculaire (Armulik *et al*, 2005).

1.3.3.2 Les angiopoïétines (Ang)

La famille des angiopoïétines est composée de 4 membres (Ang-1 à -4) et de deux récepteurs de type tyrosine kinase, Tie-1 et Tie-2. Le récepteur Tie-2 exprimé principalement à la surface des cellules endothéliales et des cellules hématopoïétiques, est nécessaire pour le développement normal des vaisseaux. Contrairement au récepteur Tie-2, aucun ligand n'a été identifié pour le récepteur Tie-1. En effet, les 4 angiopoïétines

se lie au Tie-2 et soit induisent, son activation (Ang-1 et -4), soit agissent comme des antagonistes (Ang-2 et -3) (Yancopoulos *et al*, 2000).

L'interaction de l'Ang-1/Tie-2 est responsable du maintien de l'intégrité des vaisseaux sanguins en renforçant les interactions entre les cellules endothéliales et les cellules périvasculaires de soutien (péricytes et cellules musculaires lisses) et en stimulant le recrutement de ces cellules. Par contre, l'action antagoniste d'Ang-2, via l'inhibition du récepteur Tie-2, conduit à une perte de contact entre les cellules endothéliales et les cellules périvasculaires, libérant l'accès aux facteurs angiogéniques, tels que le VEGF, aux cellules endothéliales. Ainsi, le VEGF, Ang-1 et Ang-2 possèdent des rôles complémentaires dans le développement et le maintien du réseau vasculaire.

1.3.4 L'angiogenèse endométriale

L'endomètre est vascularisé principalement par l'artère radiale du myomètre, dont les branchements donnent naissance à des artères au niveau de l'endomètre basal. Au niveau de la couche fonctionnelle, les artères sont spiralées et se prolongent en artérioles puis en un plexus capillaire au niveau de la couche la plus superficielle de l'endomètre, en contact avec la lumière utérine. D'un point de vue maturation et stabilisation, l'artère radiale est entourée d'une couche épaisse de cellules musculaires lisses exprimant l'actine α [α -smooth muscle actin (α -SMA)], ainsi que la chaîne lourde de la myosine [myosin heavy chain (MHC)] (Abberton *et al*, 1999). Au fur et à mesure que les artères convergent vers la lumière endométriale, elles perdent des cellules musculaires lisses périvasculaires jusqu'à atteindre le plexus capillaire sub-épithélial qui est formé seulement de cellules endothéliales et n'exprime plus l' α -SMA (Smith, 2001).

1.3.4.1 Mécanisme de la néovascularisation endométriale

Le réseau vasculaire endométrial présente un ensemble de propriétés qui lui sont bien spécifiques. Contrairement aux autres tissus et organes dont les vaisseaux sanguins gardent une structure et une fonction relativement stables tout au long de leur vie, le réseau vasculaire endométrial de la couche fonctionnelle subit des cycles de déstructuration et de régénération périodiques. Trois cycles d'angiogenèse sont observés au cours du cycle menstruel : (1) durant les menstruations (angiogenèse réparatrice), (2) durant le développement rapide de l'endomètre au cours de la phase proliférative et (3) durant la phase sécrétoire au moment où les artères spiralées prolifèrent et s'enroulent.

Comme mentionné précédemment, l'angiogenèse est un processus qui peut s'effectuer par 4 mécanismes différents : bourgeonnement, intussusception, élongation et incorporation de cellules endothéliales circulantes dans les vaisseaux endométriaux. Plusieurs pistes suggèrent que l'angiogenèse par bourgeonnement ne représente pas le principal mécanisme de néovascularisation dans l'endomètre. En effet, les structures rappelant un bourgeonnement vasculaire n'ont pas été identifiées au niveau du tissu endométrial (Ono & Shiina, 2001).

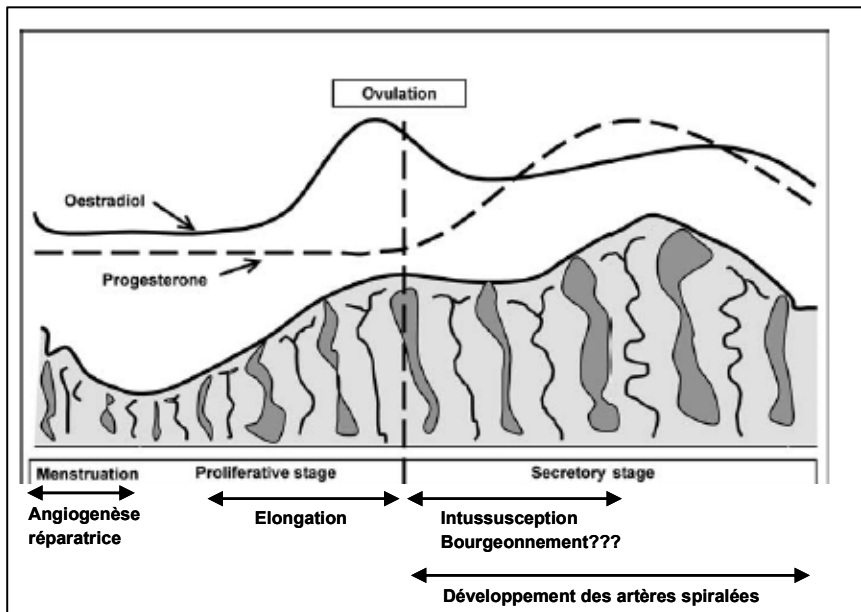


Figure 9 : Les différents mécanismes d'angiogenèse proposés durant le cycle menstruel endométrial (Girling & Rogers, 2005).

Au niveau de l'endomètre, la prolifération des cellules endothéliales est toujours associée à l'élongation d'un vaisseau et non au bourgeonnement d'un nouveau branchement vasculaire. En confirmation aux données précédentes, Hii et al ont montré que l'immunomarquage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, spécifique de l'angiogenèse bourgeonnante, n'est observé qu'au niveau des vaisseaux quiescents. (Hii & Rogers, 1998). Cette théorie a été renforcée par le développement d'une méthode stéréologique étudiant les structures anisotropiques, c'est-à-dire, des structures avec une orientation bien définie au niveau de l'endomètre. Cette étude a montré clairement que l'élongation est le mécanisme angiogénique principal durant la phase mi-proliférative du cycle menstruel (Gambino *et al*, 2002). A ce jour, l'élongation et l'intussusception restent les deux voies de néovascularisation principales démontrées au niveau de l'endomètre (Figure 9).

1.3.4.2 Contrôle hormonal de la néovascularisation endométriale

La croissance et le développement endométriaux sont sous le contrôle des hormones stéroïdiennes. Cependant, le mode d'action de ces hormones sur la régulation

de la néovascularisation n'est pas bien défini. Même si des études ont été réalisées concernant les effets des progestatifs sur le réseau vasculaire endométrial dans le cas de thérapie hormonale, peu d'études ont été effectuées sur l'endomètre en cycle spontané. Néanmoins, l'effet de l'œstradiol a été plus documenté que celui de la progestérone. En effet, l'expression des récepteurs aux oestrogènes (ER α et ER β) par les cellules périvasculaires et de ER β par les cellules endothéliales suppose que les œstrogènes peuvent moduler directement le réseau vasculaire via les cellules endothéliales ou indirectement via les cellules périvasculaires (Critchley *et al*, 2001).

Des controverses existent concernant l'effet oestrogénique sur la prolifération endométriale. Une étude *in vitro* de culture de cellules endothéliales endométriales montre que la prolifération de ces cellules augmente sous l'action de l'œstradiol (Kayisli *et al*, 2004). De même, une élongation des vaisseaux a été démontrée durant la phase mi-proliférative du cycle endométrial correspondant au moment de l'apparition du pic d'œstradiol (Gambino *et al*, 2002). Des études sur la brebis et le macaque ont montré une augmentation de la densité vasculaire après traitement à l'oestradiol (Reynolds *et al*, 1998;Nayak & Brenner, 2002). Contrairement à ces données, des équipes utilisant un modèle de souris ovariectomisées et traitées à l'œstradiol, montrent soit une réduction de la surface relative des vaisseaux sanguins de l'endomètre (Ma *et al*, 2001;Heryanto & Rogers, 2002), soit aucun effet de l'hormone (Hastings *et al*, 2003). Malgré la controverse au sujet de la régulation de la vascularisation par l'oestradiol, la majorité des travaux convergent vers un effet stimulateur de la croissance vasculaire par cette hormone.

En ce qui concerne la progestérone, les études sont plus rares mais tout aussi contradictoires. Le modèle de culture de cellules endothéliales (dermiques ou endométriales) utilisé par les équipes de Vazquez et d'Iruela-Arispe montrent que ces cellules expriment le récepteur à la progestérone (PR) et que leur prolifération est inhibée sous l'effet de la progestérone (Vazquez *et al*, 1999;Iruela-Arispe *et al*, 1999). Cependant, Kayisli *et al* montrent une augmentation de la prolifération des cellules endothéliales endométriales en culture sous l'effet de la progestérone malgré l'absence de l'expression des PR (Kayisli *et al*, 2004).

Pendant la phase sécrétoire, le nombre de points de branchement des vaisseaux sanguins augmentent, suggérant qu'une prolifération des cellules endothéliales se produit sous l'effet de la progestérone, fortement exprimée durant cette phase du cycle (Gambino *et al*, 2002). De même, chez la souris et la rate, une augmentation de la prolifération des cellules endothéliales a été démontrée pendant les premiers jours de

gestation, période durant laquelle le taux de progestérone est augmenté (Goodger & Rogers, 1993;Walter *et al*, 2005).

Le début de grossesse est marqué par la sécrétion de l'hormone chorionique gonadotrope (hCG) par les cellules syncytiotrophoblastiques et les cytotrophoblastes villositaires placentaires. L'hCG va contribuer à la vascularisation du site d'implantation en favorisant la migration et la formation d'ébauches de capillaires par les cellules endothéliales de l'utérus. Des études d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie montrent que les cellules endothéliales utérine expriment le récepteur à la hCG/LH (hCG/LHR) (Lei *et al*, 1992 ; Toth *et al*, 1994). L'effet angiogénique direct de l'hCG a été déterminé via des modèles d'angiogenèse *in vitro* et *in vivo* (Zygmunt *et al*, 2002 ; Berndt *et al*, 2006). Cette hormone induit un effet angiogène paracrine indirect via une augmentation de l'expression du VEGF par les cellules épithéliales endométriales (Berndt *et al*, 2006 ; Licht *et al*, 2007).

L'effet exact des hormones stéroïdiennes n'est toujours pas bien défini. La diversité des modèles (*in vitro* et *in vivo*) et des espèces animales utilisés sont des facteurs potentiels expliquant cette variabilité. Des études supplémentaires comme celles réalisées par l'équipe de Gambino en 2002 sur l'endomètre humain en cycle spontané ont permis d'élucider de façon plus pertinente le rôle exact de l'œstradiol et de la progestérone sur l'angiogenèse (Gambino *et al*, 2002).

1.3.4.3 Les acteurs de l'angiogenèse endométriale

(a) Le VEGF :

L'expression du VEGF au niveau de l'endomètre a généralement été menée par des techniques d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie. Ces études ont montré une expression plus importante de ce facteur au niveau des cellules glandulaires par rapport aux cellules stromales essentiellement pendant la phase sécrétoire (Charnock-Jones *et al*, 1993;Li *et al*, 1994;Torry *et al*, 1996;Shifren *et al*, 1996). Contrairement aux résultats précédents, Möller et ses collaborateurs ont montré que l'expression du VEGF au niveau du stroma, des glandes et des cellules endothéliales ne varie pas au cours du cycle (Moller *et al*, 2001). De même, aucune corrélation entre le taux de VEGF et la prolifération angiogénique n'a pu être déterminée par l'équipe de Gargett (Gargett *et al*, 1999).

Le niveau d'expression du VEGF par les différents types cellulaires de l'endomètre en fonction de la phase du cycle reste jusqu'à l'heure actuelle un point de discussion entre les équipes. Cependant, plusieurs études s'accordent sur la focalisation de l'expression du VEGF par des cellules circulantes, les neutrophiles, au niveau de l'endomètre (Gargett *et al*, 2001), et que cette expression focalisée est parfaitement corrélée avec la prolifération endothéliale (Mueller *et al*, 2000).

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'œstradiol stimule l'expression du VEGF. Ainsi, l'ovariectomie chez la souris ou le macaque, suivie d'un traitement à l'œstradiol provoque une augmentation de l'expression du VEGF (Ma *et al*, 2001; Nayak & Brenner, 2002). Cette stimulation de l'expression du VEGF a également été observée lors du traitement de cellules stromales endométriales par l'œstradiol (Shifren *et al*, 1996; Perrot-Applanat *et al*, 2000). Cet effet est lié à l'existence de deux sites homologues aux éléments de réponse aux œstrogènes au niveau du gène codant pour le VEGF (Hyder *et al*, 2000).

Le VEGF-B n'est pas exprimé au niveau de l'endomètre, tandis que le VEGF-C présente une très faible expression au niveau des cellules du stroma associées aux cellules NK utérines. Ces mêmes cellules NK expriment le PLGF (Tayade *et al*, 2007). Les souris déficientes en cellules NK montrent des anomalies de remodelage vasculaire (Croy *et al*, 2000b). L'expression des VEGF-R1 et R2 est aussi régulée au cours du cycle menstruel. En effet, au cours de la phase proliférative, le VEGF-R2 est exprimé plus intensément. Alors qu'après l'ovulation, l'expression de VEGF-R1 prédomine. Cette expression différentielle des récepteurs au VEGF est importante à signaler puisque la liaison du substrat à l'un ou l'autre n'induit pas les mêmes effets. En effet, la liaison du VEGF au récepteur de type 2 (R2) augmente la prolifération des cellules endothéliales tandis que celle au récepteur de type 1 (R1) induit la migration des cellules et non leur prolifération (Meduri *et al*, 2000).

Un dérèglement de l'expression du VEGF a été démontré dans plusieurs pathologies. En effet, la quantité de VEGF plasmatique en cas de cancer est corrélée au degré de vascularisation de la tumeur primaire et s'avère être un facteur de mauvais pronostic. De même, une augmentation de l'expression de ce facteur a été démontrée chez les femmes sous traitement progestatif (Norplant[®] ou système intra-utérin à libération de Levonorgestrel) souffrant de saignements irréguliers (Lau *et al*, 1999; Roopa *et al*, 2003; Charnock-Jones *et al*, 2000) ou encore chez des femmes ménorragiques (Mints *et al*, 2005). La pré-éclampsie est également caractérisée par une augmentation de l'expression du VEGF total et de la forme soluble du VEGFR1 (sVEGFR1) (Hayman *et al*, 1999; Tsatsaris *et al*, 2003; Ahmad & Ahmed, 2004).

(b) Le FGF :

Des études *in vivo* sur le macaque ont montré que l'expression du FGF-1 et non celle du FGF-2 est stimulée par l'œstradiol (Samathanam *et al*, 1998), tandis que le blocage du récepteur à la progestérone par le RU-486 provoque une diminution de l'expression du FGF-2 au niveau des cellules stromales utérines de rate (Rider & Psychoyos, 1994). Ceci est confirmé par l'augmentation du taux du FGF-2 chez les femmes ayant bénéficié d'un stérilet à libération de Levonorgestrel (Roopa *et al*, 2003).

(c) Les angiopoïétines :

Dans l'endomètre, l'étude par immunohistochimie de l'expression des angiopoïétines et de leur récepteur Tie-2 a révélé que l'expression d'Ang-1 est spécifique des cellules stromales alors que celle d'Ang-2 et de Tie-2 est spécifique des cellules endothéliales sans modulation importante au cours du cycle menstruel (Krikun *et al*, 2000). L'analyse par RT-PCR de ces facteurs dans chaque type cellulaire, isolé par microdissection confirme les données précédentes (Krikun *et al*, 2004). Cependant, Hirchenhain a montré une augmentation de la concentration de l'ARNm codant pour Ang-1 pendant la phase sécrétoire (Hirchenhain *et al*, 2003) au niveau de biopsies endométriales. Plusieurs pathologies sont associées à une expression défectueuse des angiopoïétines. En effet, une diminution de l'expression d'Ang-1 a été observée chez des femmes ménorragiques (Hewett *et al*, 2002), ainsi que chez les femmes bénéficiant d'un traitement progestatif local intra-utérin (Krikun *et al*, 2002).

(d) Les thrombospondines :

Au niveau de l'endomètre, l'expression de TSP-1 est limitée à la phase sécrétoire (Iruela-Arispe *et al*, 1996; Seki *et al*, 2001). En effet, la culture de cellules stromales endométriales ou des cellules Ishikawa (lignée cellulaire cancéreuse épithéliale d'endomètre) en présence de progestérone stimule l'expression de TSP-1 (Iruela-Arispe *et al*, 1996; Mirkin & Archer, 2004). Ces informations pourraient confirmer les études citées précédemment, montrant une inhibition de la prolifération des cellules endothéliales en présence de progestérone (Vazquez *et al*, 1999; Iruela-Arispe *et al*, 1999). La modulation de l'expression de TSP-1 par la progestérone est due à la présence de deux éléments de réponse à la progestérone au niveau du promoteur. L'expression de TSP-2 n'a pas été démontrée au niveau de l'endomètre.

1.4 Progestatifs et endomètre

Les deux principales hormones impliquées dans le cycle reproducteur féminin sont l'œstradiol et la progestérone. Leurs niveaux de sécrétion varient en fonction de l'âge, ils augmentent à la puberté et diminuent à la ménopause et présentent, durant la période d'activité génitale des variations cycliques de 28 jours. Dans les chapitres précédents, nous avons présenté le rôle physiologique joué par ces hormones, sur l'orchestration des différentes modifications subies par l'endomètre en termes de prolifération, croissance et dégénérescence, ainsi que leurs conséquences sur le réseau vasculaire.

L'administration d'hormones de synthèse est fréquente en contraception et en traitement hormonal de substitution lors de la ménopause. De même, l'œstradiol est utilisé pour traiter les déficiences de sécrétion ovarienne à l'adolescence ou à l'âge adulte et après la ménopause. La progestérone ou des progestatifs de synthèse sont utilisés en cas de déficience lutéale et en contraception, mais également comme traitement anti-tumoral.

1.4.1 Les progestatifs

Les progestatifs de synthèse se différencient de la progestérone par plusieurs modifications chimiques. On en distingue deux types dérivés de la progestérone : (i) la 17- α -hydroxyprogestérone et (ii) la 19-norprogestérone. Le dérivé de la testostérone est le 19-nortestostérone. Le terme « nor » est utilisé lorsqu'il n'y a pas de substituant méthyl en position 19.

1.4.1.1 Classification des progestatifs

- Les progestatifs dérivés de la testostérone

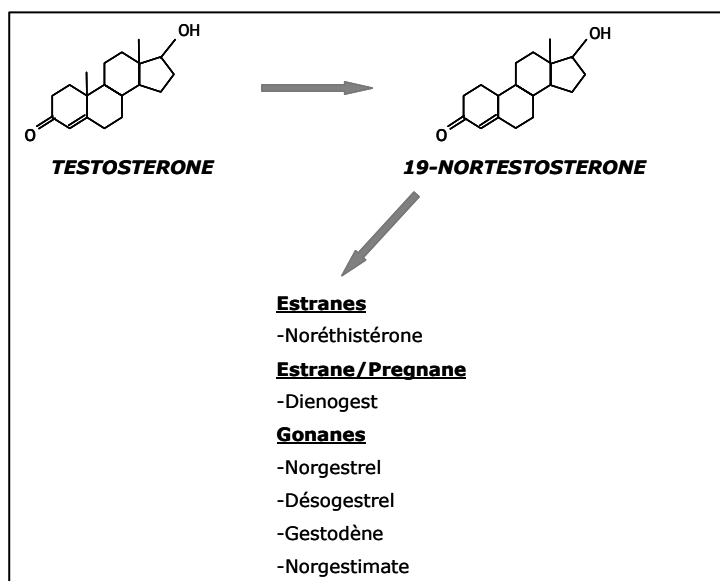


Figure 10 : Classification des différents progestatifs de synthèse dérivés de la testostérone. Ces dérivés forment trois classes de progestatifs : les estranes, estrane/pregnane et gonanes.

- Les progestatifs dérivés de la progestérone

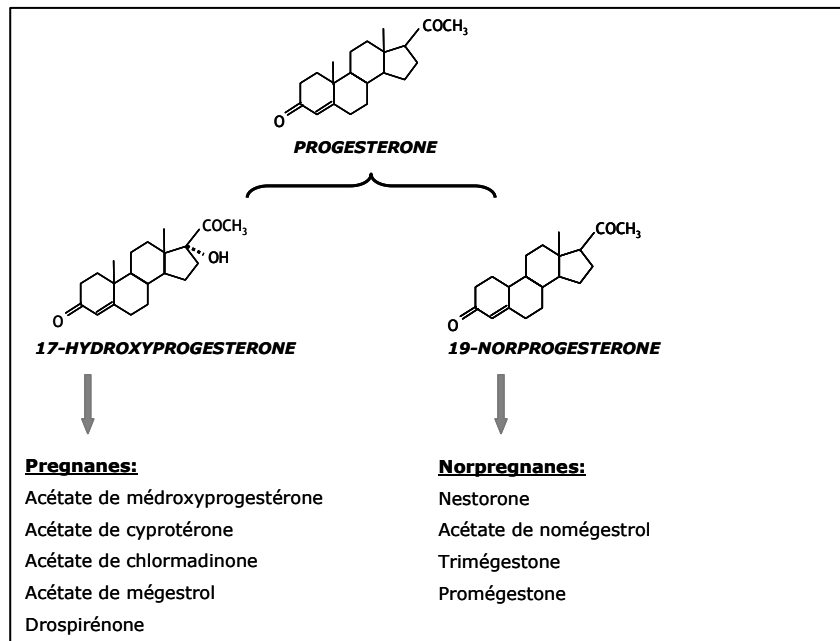


Figure 11 : Classification des différents progestatifs synthétiques dérivés de la progestérone. Ces dérivés forment deux classes de progestatifs ; les pregnanes et les norpregnanes.

La médroxyprogestérone, outre son utilisation chez la femme comme contraceptif, est utilisée à posologie très élevée pour son effet anti-œstrogène, dans le traitement de certains cancers du sein et de l'endomètre (200 à 500 mg/jour).

1.4.1.2 Les modes de contraception

Les contraceptifs hormonaux peuvent être composés d'un progestatif seul ou d'une combinaison œstro-progestative. Ils exercent leurs effets en agissant principalement à trois niveaux : (i) sur l'axe hypothalamo-hypophysaire en bloquant l'apparition du pic de LH (Hormone Lutéinisante), inhibant ainsi l'ovulation ; (ii) en supprimant les modifications subies par l'endomètre en vue d'une nidation et (iii) en épaississant la glaire cervicale afin d'empêcher les spermatozoïdes de franchir le col de l'utérus.

De nombreuses modalités d'administration de ces contraceptifs hormonaux existent :

- Par voie orale (pilule) ;
- Par voie injectable où le progestatif est administré sous forme de préparation à libération prolongée pendant 3 mois. Cette méthode entraîne une imprégnation permanente par le progestatif à concentration élevée. Ce mode de contraception est réservé aux femmes incapables de prendre en charge elles-mêmes leur traitement contraceptif ;
- Par implant sous-cutané où le contraceptif est encapsulé dans des implants placés sous la peau au niveau du bras. Le progestatif diffuse de manière continue durant 5 ans (Exp : Norplant®) ;

- Par voie locale où le progestatif est associé à un dispositif intra-utérin (Ex : Mirena®) ;
- Par voie transdermique sous forme de patch (Ex : Evra®)
- Par voie vaginale sous forme d'anneau (Ex : Nuvaring®)

1.4.1.3 Le Mirena®

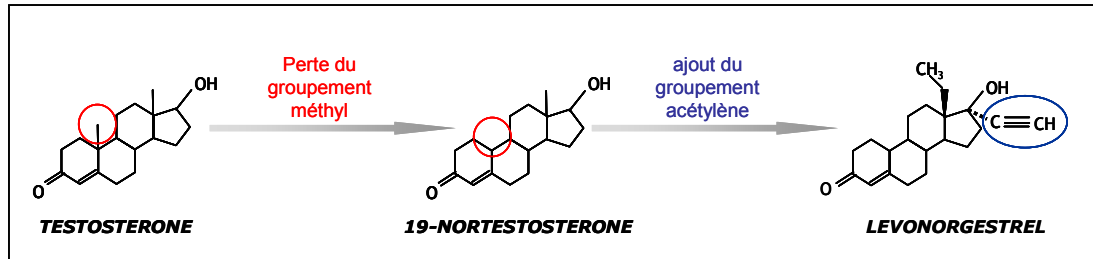


Figure 12 : Formule chimique du lévonorgestrel, progestatif dérivé de la testostérone.

L'absence du substituant méthyl en position 19 (indiqué par le cercle rouge) au niveau du 19-nortestostérone, augmente les propriétés progestatives et diminue l'action androgénique de la testostérone. L'ajout d'un groupement acétylène au lévonorgestrel engendre une perte de l'activité androgénique et augmente la résistance à la dégradation hépatique, ce qui lui permet d'être administré par voie orale.

Mirena® est un système intra-utérin (SIU) en forme de T qui, après son insertion, libère localement un progestatif, le Levonorgestrel. La forme en T est destinée à ajuster le dispositif à la forme de l'utérus (Figure 13). La tige verticale porte un cylindre qui contient l'hormone. Son utilisation n'est pas limitée à la contraception. Son efficacité a aussi été étudiée dans certaines affections, telles que fibromes, adénomyose, métrorragie (Wildemeersch & Schacht, 2001) et dysménorrhée, ou dans certains cas physiologiques, tels que le traitement hormonal substitutif de la ménopause en association avec un œstrogène.

(a) Propriétés pharmacologiques :

Le Levonorgestrel (LNG) est un progestagène utilisé à différentes fins en gynécologie. Cette méthode permet d'administrer une dose quotidienne très faible (20µg/24h) puisque l'hormone est libérée directement dans l'organe cible. Grâce aux faibles concentrations plasmatiques, les effets métaboliques sont minimes.

Le mécanisme d'action du Mirena® est principalement basé sur les effets suivants : un épaissement de la glaire cervicale gênant la pénétration des spermatozoïdes, surtout une prévention de la prolifération endométriale, et plus rarement une inhibition de l'ovulation (Figure 13).

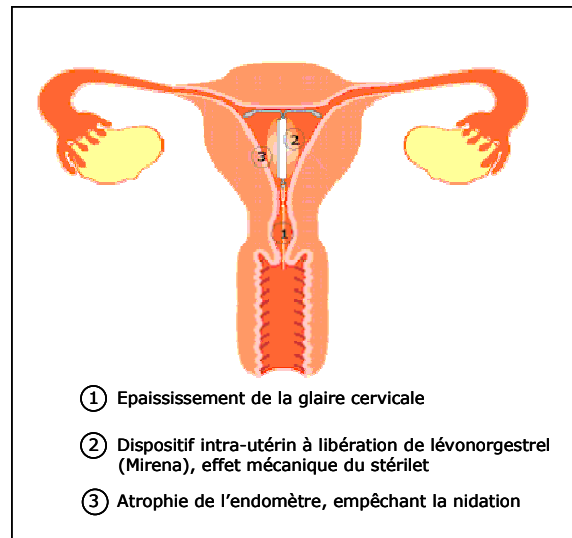


Figure 13 : Les effets induits par un dispositif intra-utérin à libération de Levonorgestrel. Représentation schématique d'un Mirena® dans la cavité utérine et ses 3 effets principaux indiqués par les chiffres 1, 2 et 3.

(b) Effets secondaires

Le principal et le plus fréquent effet secondaire observé chez les femmes utilisant un Mirena®, comme moyen de contraception ou en thérapie hormonale, consiste en des saignements intermenstruels, essentiellement les six premiers mois qui suivent l'insertion du dispositif (Sturridge & Guillebaud, 1997). Ces saignements sont généralement peu abondants, appelés souvent «spotting», mais leur durée et leur fréquence sont très variables. On parle alors de **métrorragies dysfonctionnelles** sous contraceptifs.

Une femme sur 20 consulte pour des problèmes de saignement, tous types confondus [ménorragies et métrorragies (saignements intermenstruels dysfonctionnels, liés à la contraception ou encore pathologiques suite à un cancer ou un fibrome)] (Garside *et al*, 2004) (Figure 14).

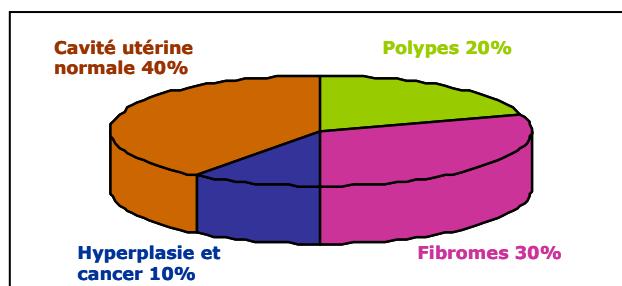


Figure 14 : Conditions associées aux saignements utérins anormaux chez les femmes âgées entre 30 et 50 ans. D'après (Collins & Crosignani, 2007).

La majorité (40%) des femmes présentant une cavité utérine normale, comme indiqué dans la figure 14, subissent des saignements causés par les différents modes de contraception utilisés.

Les femmes sous Mirena® peuvent également ressentir une tension mammaire, des céphalées, ainsi que des douleurs dorsales et dans le bas du ventre.

1.4.2 Les effets du Levonorgestrel sur l'endomètre

Comparé aux autres traitements hormonaux, le Mirena® présente des avantages considérables. En effet, en raison de son action locale dans la cible utérine et de la faible concentration sérique en hormone, il altère peu le cycle ovarien et l'équilibre hormonal naturel. D'autres conséquences importantes liées à ce moyen de contraception sont l'absence de risque d'oubli et la réduction des grossesses ectopiques. De même, dans le cas de ménorragies, une nette augmentation du taux d'hémoglobine et de fer sérique a été démontré après l'utilisation d'un système intra-utérin à libération de Levonorgestrel (SIU-LNG), ce qui présente un avantage important pour les femmes anémiques.

Malgré les avantages énumérés précédemment, les saignements imprévus représentent la cause principale d'arrêt chez 20 à 25% des utilisatrices (Vekemans, 1995; Vekemans *et al*, 1997).

Il est important de noter que les saignements décrits dans le cas du Mirena® sont aussi observés avec d'autres contraceptifs, progestatifs tels que le Norplant® ou certaines pilules. Plusieurs équipes se sont penchées sur la problématique de ces saignements irréguliers et ont essayé d'identifier et de comprendre les mécanismes et les facteurs qui les orchestrent.

1.4.2.1 Histologie générale de l'endomètre sous LNG

Il résulte de l'utilisation d'un SIU-LNG une atrophie des glandes, associée à une décidualisation du stroma, ainsi qu'à une augmentation de l'infiltration granulocytaire et macrophagique (Critchley *et al*, 1998). Ces modifications résultent de l'action du LNG sur les récepteurs hormonaux et sur les facteurs de croissance. En effet, le progestatif inhibe la réponse aux œstrogènes en diminuant significativement l'expression des récepteurs aux œstrogènes (ER), mais également celles des récepteurs à la progestérone (PR) (Zhu *et al*, 1999; Charnock-Jones *et al*, 2000; Galant *et al*, 2004; Vereide *et al*, 2006).

L'atrophie de l'endomètre est également corrélée à une diminution de la prolifération cellulaire et à une augmentation de l'apoptose des cellules glandulaires et stromales sous l'effet du Levonorgestrel (Maruo *et al*, 2001).

1.4.2.2 Saignements irréguliers et dégradation tissulaire

L'étude histologique de biopsies endométriales provenant de femmes souffrant de métrorragies dysfonctionnelles sous progestatifs montre des foyers de dégradation et une lyse des fibres de collagène au niveau du stroma (Galant *et al*, 2000). Ce phénotype est similaire à celui observé au moment des menstruations, et se produit en partie, sous l'effet de diverses enzymes de la matrice extracellulaire. Ainsi, plusieurs études ont été réalisées afin d'identifier les différentes familles de protéases matricielles pouvant contribuer à ces saignements irréguliers.

Parmi ces protéases, on distingue les cathepsines, les protéases à sérine et les métalloprotéases, qui contribuent au remodelage de la matrice interstitielle dans divers phénomènes physiologiques (cicatrisation, placentation,...) et pathologiques (progression tumorale,...). Contrairement aux autres protéases, la famille des métalloprotéases (MMPs), qui sera détaillée dans les chapitres suivants, fait partie des facteurs les plus étudiés dans les métrorragies dysfonctionnelles. En effet, plusieurs études ont montré l'augmentation de quelques-unes d'entre elles au niveau de biopsies d'endomètre chez des femmes sous progestatif (Norplant ou LNG-SIU), telles que la MMP-1 (Vincent & Salamonsen, 2000; Milne *et al*, 2001), la MMP-3 (Vincent *et al*, 2000; Oliveira-Ribeiro *et al*, 2004), la MMP-9 (Skinner *et al*, 1999; Vincent *et al*, 1999) et la MMP-26 (Chegini *et al*, 2003), de même qu'un dérèglement d'expression de leurs inhibiteurs tissulaires TIMPs (Tissue inhibitor of metalloproteinases) (Hickey *et al*, 2006). L'utilisation de médroxyprogestérone en injection est également associée à des saignements dysfonctionnels, corrélés à une expression importante de la MMP-9, ainsi que des TIMP-1, -2 et -3 (Vincent *et al*, 2002).

1.4.2.3 Saignements irréguliers et réseau vasculaire

L'étude des facteurs contribuant aux métrorragies dysfonctionnelles ne peut être réalisée sans approfondir les recherches sur la modulation de l'angiogenèse et des facteurs angiogènes sous l'effet de progestatif. Comme décrit dans le chapitre précédent, le VEGF est le facteur angiogénique le plus important au niveau de l'endomètre. Ainsi, plusieurs équipes ont analysé l'expression de ce facteur au niveau de biopsies d'endomètre sous progestatifs (Norplant[®] ou SIU-LNG).

Les résultats obtenus sont controversés. Alors que certaines équipes montrent une augmentation de l'expression du VEGF sous progestatifs (Lau *et al*, 1999; Roopa *et al*, 2003; Pritts *et al*, 2005), d'autres démontrent une diminution de cette expression (Laoag-Fernandez *et al*, 2003; Moller *et al*, 2005).

D'autres facteurs angiogéniques étudiés, tels que le TGF β 1 (Tumor growth factor β 1) et FGF-2, montrent une augmentation d'expression sous Levonorgestrel (Roopa *et al*, 2003), tandis que l'angiopoïétine-1 (Ang-1) diminue chez les femmes bénéficiant d'un SIU-LNG (Krikun *et al*, 2002). Ces variations d'expression de facteurs pro-ou anti-angiogènes peuvent contribuer à ces saignements irréguliers.

La stabilisation du réseau vasculaire par les péricytes et les cellules musculaires lisses joue un rôle important durant l'angiogenèse et la maturation des vaisseaux sanguins. Il a été démontré que les femmes souffrant de métrorragies dysfonctionnelles, présentent des vaisseaux fragiles plus susceptibles à la rupture et aux saignements (Hickey *et al*, 2000). L'équipe de Rogers a également montré une diminution du nombre de péricytes autour des vaisseaux sanguins au niveau de l'endomètre de femmes sous progestatifs présentant des saignements irréguliers (Rogers *et al*, 2000).

D'autres équipes ont montré une augmentation de la densité du réseau vasculaire chez les femmes bénéficiant d'un SIU-LNG (Hague *et al*, 2002; McGavigan *et al*, 2003).

2. La reproduction murine

2.1 Physiologie de l'endomètre

2.1.1 Système reproducteur femelle de la souris

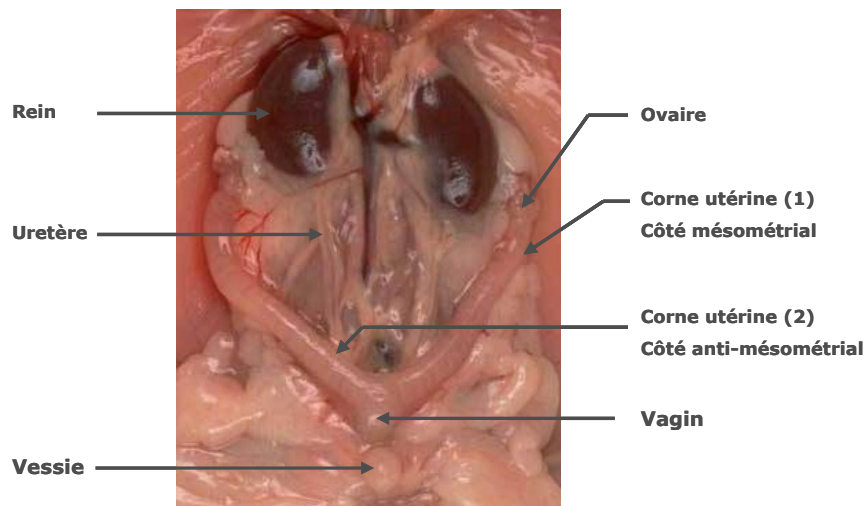


Figure 15 : Dissection de l'appareil reproducteur femelle chez la souris

Le système reproducteur de la souris femelle se compose de 2 ovaires, de 2 trompes de Fallope, de 2 cornes utérines, ainsi que du col utérin et du vagin (Figure 15). Les ovaires sont attachés par des ligaments à la partie terminale des cornes utérines et aux reins. L'utérus de la souris est en forme de «Y» et est constitué de deux cornes qui

s'étendent des trompes de Fallope jusqu'à la partie dorsale de la vessie. La paroi de l'utérus est constituée de 3 couches superposées. De la lumière de l'organe vers l'extérieur, on distingue : l'endomètre, le myomètre constitué de deux couches musculaires lisses et la séreuse.

2.1.2 Le cycle ovarien

La puberté chez la souris est atteinte entre les 4^{èmes} et les 5^{èmes} semaines post natales. Chaque cycle ovarien dure généralement 4 à 5 jours et est divisé en 4 phases : proœstrus, œstrus, métœstrus et dioœstrus (Tableau 4). La gestation dure entre 18 et 21 jours et la placentation est de type hémochorial. Par portée, une souris peut avoir 6 à 12 souriceaux.

Période du cycle	Proœstrus	Œstrus	Métœstrus	Dioœstrus
Durée	1j	12h	1j	2.5j
Follicules	Les follicules se développent et peuvent suivre 2 voies : ils mûrissent et libèrent l'ovule ou sécrètent des œstrogènes	Phase courte, pic de LH qui entraîne la déhiscence folliculaire et la formation du corps jaune	Organisation fonctionnelle du corps jaune, production de la progestérone et transformation lutéale de l'endomètre	Correspond à la phase lutéale du cycle menstruel humain. Les corps jaunes sécrètent la progestérone pour maintenir la grossesse. Dans le cas contraire, les corps jaunes dégènèrent.
Histologie de l'endomètre	Une seule population cellulaire avec un cytoplasme bien défini et un noyau plurilobé	Processus de kératinisation, les noyaux disparaissent. Les cellules sont dites cornifiées	Les cellules cornifiées sont infiltrées par des leucocytes	Une majorité de leucocytes avec quelques cellules cornifiées

Tableau 4 : Caractéristiques des différentes phases du cycle ovarien chez la souris. D'après (Tsampalas et al, 2007)

Contrairement à ce qui se passe chez la femme, le cycle ovarien chez la souris diffère en durée selon que la femelle s'accouple ou non. Si aucun rapprochement sexuel n'a eu lieu au moment de l'ovulation, le dioœstrus (la phase lutéale) ne durera que 2-3 jours. Si la femelle subit un coït infertile au moment de l'ovulation, par exemple, avec un mâle vasectomisé, sa phase lutéale sera de 11-12 jours (dénommée pseudo-gestation).

Si une femelle isolée des mâles est subitement exposée à un mâle, un cycle ovarien d'une durée moyenne de 4 jours sera immédiatement initié, provoquant un œstrus durant lequel les ovules sont prêts pour la fécondation. La présence d'un bouchon muqueux au niveau de l'orifice vaginal, indique qu'un accouplement fructueux a eu lieu.

2.1.3 De la fécondation à la formation du blastocyste

La fécondation a lieu au niveau de l'extrémité supérieure de l'oviducte, généralement 2 heures après l'ovulation. Au moment de l'ovulation, le sperme du mâle est généralement présent dans l'oviducte mais un délai de quelques heures sépare l'ovulation de la pénétration du spermatozoïde dans l'ovule. La première division est réalisée quand l'œuf est toujours dans l'oviducte environ 24 heures après l'accouplement et donne naissance à deux cellules filles. Après 3 divisions mitotiques, l'œuf fécondé atteint le stade de 16 cellules appelé «morula», et passe de l'oviducte vers l'utérus, plus ou moins 60 heures après la fécondation. Une fois dans l'utérus, l'œuf continue à se diviser jusqu'à atteindre le stade de 32 cellules. A ce stade, une cavité se creuse et le blastocyste se forme au stade de 62 cellules et s'installe dans une crypte utérine environ 4 à 4.5 jours *post coïtum* (Figure 16).

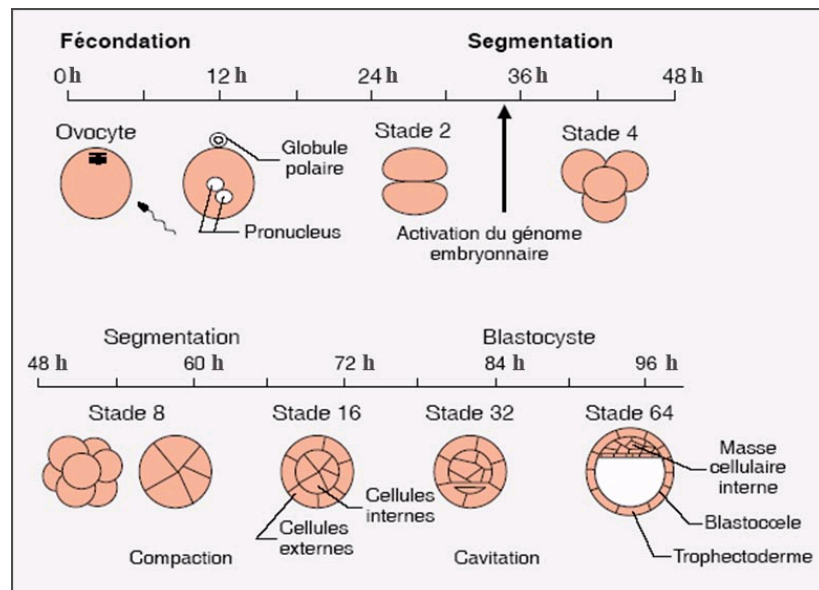


Figure 16 : Différents stades de la division cellulaire de l'œuf fécondé: de la fécondation jusqu'au stade blastocyste (Aghion & Poirier, 2000).

Le blastocyste est formé de deux types cellulaires : la masse cellulaire interne (MCI), qui donnera naissance à l'embryon proprement dit, et le trophoctoderme, qui se différencie en plusieurs lignées cellulaires trophoblastiques formant le placenta. Le sort de chaque type cellulaire se décide au stade morula où deux facteurs principaux jouent un rôle important (Cross, 2000):

(1) *la position des blastomères* : au stade morula, au moment de la compaction, toutes les cellules positionnées à l'intérieur donnent naissance à la masse cellulaire interne, alors que les cellules positionnées à l'extérieur se différencient en trophoctoderme ;

(2) *des facteurs de transcription* spécifiques de chaque type cellulaire contribuent à leur future différenciation. Ainsi, les cellules de la masse cellulaire interne expriment les facteurs *Oct4* (Nichols *et al*, 1998), *Sox2* (Avilion *et al*, 2003) et *Nanog* (Chambers *et al*, 2003), alors que le facteur *cdx2* est exprimé par les cellules composant le trophoctoderme (Kunath *et al*, 2004).

L'importance de ces facteurs a été démontrée par différentes études. Les souris déficientes pour *cdx2* forment des blastocystes mais ne maintiennent pas l'identité trophoctodermique et forment une masse cellulaire exprimant *Oct4* incapable d'éclore de la zone pellucide (Kunath *et al*, 2004). De même, les souris déficientes pour *Oct4* peuvent former des blastocystes, mais la MCI n'est pas bien identifiée et exprime des marqueurs de différenciation trophoctodermique (Nichols *et al*, 1998).

De façon très intéressante, les signaux qui stimulent la prolifération des cellules trophoblastiques sont originaires de la MCI. Ainsi, le développement du placenta dépend d'un contact direct avec un embryon viable (Cross, 2000). Le FGF-4 est un facteur primordial dans la différenciation des cellules du trophoctoderme. En effet, (i) le FGF-4 est exprimé par les cellules de la MCI (Feldman *et al*, 1995) et son récepteur, le FGF-R2, est exprimé par le trophoctoderme (Arman *et al*, 1998); (ii) les souris déficientes pour le FGF-4 (Feldman *et al*, 1995) ou le FGF-R2 (Arman *et al*, 1998) arrêtent leur développement au stade blastocyste; et (iii) des cellules souches trophoblastiques sont obtenues en cultivant des cellules du blastocyste en présence de FGF-4 (Tanaka *et al*, 1998).

2.2 La fenêtre implantatoire

L'implantation des embryons a lieu chez la souris entre le 4^{ème} et le 5^{ème} jour *post coïtum*, lorsque les cellules du trophoctoderme entrent en contact avec l'épithélium utérin. Cette situation nécessite une synchronisation de la maturation des deux tissus, assurée par différents facteurs de croissance et molécules d'adhésion. Lors de l'éclosion du blastocyste de la zone pellucide, les cellules du trophoctoderme acquièrent des propriétés invasives, on parle alors de «trophoblastes», simultanément, l'utérus doit être en phase réceptive, dénommée «fenêtre implantatoire».

L'implantation se déroule en 3 phases successives : l'apposition, l'adhésion et l'invasion. Cette succession d'événements dure environ 24 heures chez la souris.

Tout au long de ce contact, un dialogue est établi entre le tissu maternel et le blastocyste afin de permettre l'interaction étroite entre les deux types cellulaires de fond génétique différent. Plusieurs facteurs sont surexprimés ou exprimés uniquement pendant l'implantation, tels que le Tumor Growth Factor- α (TGF α) (Paria *et al*, 2000), l'Heparin-Binding Epidermal Growth Factor (HB-EGF) (Das *et al*, 1994;Paria *et al*, 2000), l'Interleukine-1 (IL-1), l'IL-6, le Tumor Necrosis Factor- α (TNF α) et le Colony Stimulating Factor-1 (CSF-1) (Carson *et al*, 2000). L'absence d'implantation chez les souris déficientes pour le Leukemia Inhibitory Factor-1 (LIF-1) ou la Cyclo-oxygenase-2 (Cox-2, qui intervient dans la biosynthèse des prostaglandines), montre que ces facteurs sont indispensables à la gestation (Stewart *et al*, 1992;Lim *et al*, 1997;Lim *et al*, 1999;Kimber, 2005)

2.2.1 L'apposition

La phase d'apposition correspond au simple contact entre l'épithélium de la lumière endométriale et les cellules du trophoctoderme. Des études ont montré que plusieurs lectines, telles que les galectines-1 (Poirier *et al*, 1992), -3 et -5 (Aghion & Poirier, 2000) sont spécifiquement exprimées par le trophoctoderme au moment de l'éclosion. *In vitro*, les galectines ont une forte affinité pour deux structures glycosylées bien caractérisées, à savoir l'antigène H de type 1 et l'antigène LeY, qui jouent probablement chacune un rôle prépondérant lors de l'apposition du blastocyste (Colnot *et al*, 1998;Zhu *et al*, 1995). En effet, l'antigène H de type 1 est présent à la surface des cellules de l'épithélium utérin au jour 4.5 *post coïtum* puis disparaît au jour 5 *post coïtum*. De même, l'apposition de blastocyste sur des cellules de l'épithélium utérin en culture primaire peut être bloquée, soit en pré-incubant les embryons avec des anticorps dirigés contre l'antigène H de type 1, soit en incluant dans le milieu des résidus libres dérivés de l'antigène H de type 1 qui agissent comme compétiteurs spécifiques (Lindenberg *et al*, 1988).

Cet attachement est aussi régulé par un démasquage de macromolécules, telles que la mucine-1 (Muc-1). En effet, cette molécule joue le rôle de molécule «barrière/anti-adhésive» qui recouvre uniformément la paroi de l'utérus au cours de stades pré-implantatoires et disparaît localement aux sites d'implantation (Braga & Gendler, 1993;Carson *et al*, 1998;Aplin *et al*, 2001).

2.2.2 L'adhésion, début de pénétration

L'adhésion survient directement après la phase d'apposition de l'embryon et implique des interactions physiques entre l'épithélium trophoblastique et la partie apicale des cellules épithéliales de l'endomètre. Cette interaction fait appel à des molécules d'adhésion comme les intégrines et les cadhérines. En effet, chez la souris, le blastocyste mature, acquiert, pendant la fenêtre implantatoire, la possibilité de s'attacher à la matrice extracellulaire via l'intégrine $\alpha 7 \beta 1$ (récepteur de la laminine) (Sutherland *et al*, 1993; Klaffky *et al*, 2001). Simultanément, le stroma utérin surexprime la laminine et le collagène.

Chez la femme, pendant la phase mi-sécrétoire qui correspond à la phase d'implantation chez la souris, on observe une augmentation de l'expression des intégrines, dont l'intégrine $\alpha 5 \beta 3$. L'expression de cette intégrine n'est pas détectée chez les femmes infertiles (Klaffky *et al*, 2001).

Aplin *et al* ont révisé la contribution de plusieurs molécules d'adhésion au moment de l'implantation chez la souris et chez la femme (Aplin, 1997).

2.2.3 L'invasion

A ce stade, des quantités très importantes de substrats d'adhérence sont synthétisées par le tissu maternel, qui a subi la décidualisation du côté anti-mésométrial de l'utérus et est désormais appelé « décidue ». Parmi les facteurs d'adhérence, l'intégrine $\beta 1$ joue un rôle essentiel. En effet, chez les embryons déficients pour cette intégrine, les cellules du trophoctoderme ne pénètrent pas dans la décidue et meurent immédiatement après l'implantation (Stephens *et al*, 1995). Durant l'invasion, les cellules de l'épithélium utérin meurent par apoptose, la lame basale est détruite et les cellules du trophoctoderme pénètrent le tissu maternel (Parr *et al*, 1987). Les protéases (les métalloprotéases, les cathepsines, ...) et leurs inhibiteurs synthétisés par les cellules de la décidue et les cellules trophoblastiques, jouent un rôle primordial dans la dégradation de la membrane basale de l'épithélium utérin et dans le remodelage de la matrice extracellulaire au moment de l'invasion (Alexander *et al*, 1996; Das *et al*, 1997; Afonso *et al*, 1999; Bany *et al*, 2000; Bany & Schultz, 2001).

2.3 Le Placenta chorio-allantoïdien chez la souris

Lors de la formation du placenta, deux objectifs relativement contradictoires doivent être atteints : premièrement, l'établissement d'une connexion entre la circulation maternelle et la circulation fœtale et, deuxièmement, la protection de la mère contre

l'invasion embryonnaire. Le développement placentaire inclut plusieurs étapes primordiales telles que la différenciation cellulaire et le développement des interactions cellules-cellules. Une fois formé, vers 10.5 jours *post coïtum*, le placenta est constitué de 3 couches, une plus interne appelée «labyrinthe», une intermédiaire appelée «le spongiotrophoblaste» et une plus externe formée par les cellules géantes.

2.3.1 Différenciation des cellules trophoblastiques

Les cellules géantes présentent une taille importante due à leur polyploïdie. Elles sont les premières cellules trophoblastiques à se différencier. Les cellules géantes primaires résultent de la transformation des cellules du trophoctoderme, les secondaires dérivent quant à elles du cône ectoplacentaire et plus tard du spongiotrophoblaste (Cross, 2000) (Figure 17B). La différenciation de chaque type cellulaire trophoblastique requiert l'expression de facteurs de transcription possédant un domaine bHLH (basic helix-loop-helix). En effet, les cellules souches du chorion expriment le gène *Mash2* (Guillemot et al, 1994; Nakayama et al, 1997), une fois différenciées en cellules du cône ectoplacentaire/spongiotrophoblaste, les cellules expriment le gène *Hand1* (Cross et al, 1995). La différenciation en cellules géantes induit l'absence d'expression de *Mash2* et l'expression du gène *Stra13* en plus du gène *Hand1* déjà exprimé (Boudjelal et al, 1997) (Figure 17A).

Les embryons déficients pour le gène *Hand1* ne se développent pas au delà du 8^{ème} jour *post coïtum*. Leur placenta présente un cône ectoplacentaire de taille réduite et les cellules trophoblastiques ne se différencient pas en cellules géantes (Riley et al, 1998). La protéine codée par le gène *Hand1* induit donc la différenciation des cellules géantes tandis que *Mash2* les maintient au stade précurseur.

La formation du labyrinthe résulte de la fusion du chorion avec l'allantoïde qui se développe à partir de la portion postérieure de l'embryon. Cette fusion se produit entre le 8^{ème} et le 9^{ème} jour *post coïtum* et requiert l'interaction de deux molécules, la protéine d'adhésion VACAM-1 (Vascular cell adhesion molecule 1) exprimée par l'allantoïde (Gurtner et al, 1995), et l'intégrine $\alpha 4$ exprimée par le chorion (Yang et al, 1995). Ce type de placentation est appelé «placentation chorio-allantoïdienne». Les cellules trophoblastiques constituant le labyrinthe et entourant les sinus sanguins dans lesquels baigne le sang d'origine maternelle forment le syncytiotrophoblaste. Ces dernières expriment également des gènes codant pour des protéines de la famille bHLH qui leur sont spécifiques et dont le plus important est le gène *Gcm1* (*Glial cells missing*) (Basyuk et al, 1999; Anson-Cartwright et al, 2000) (Figure 17B).

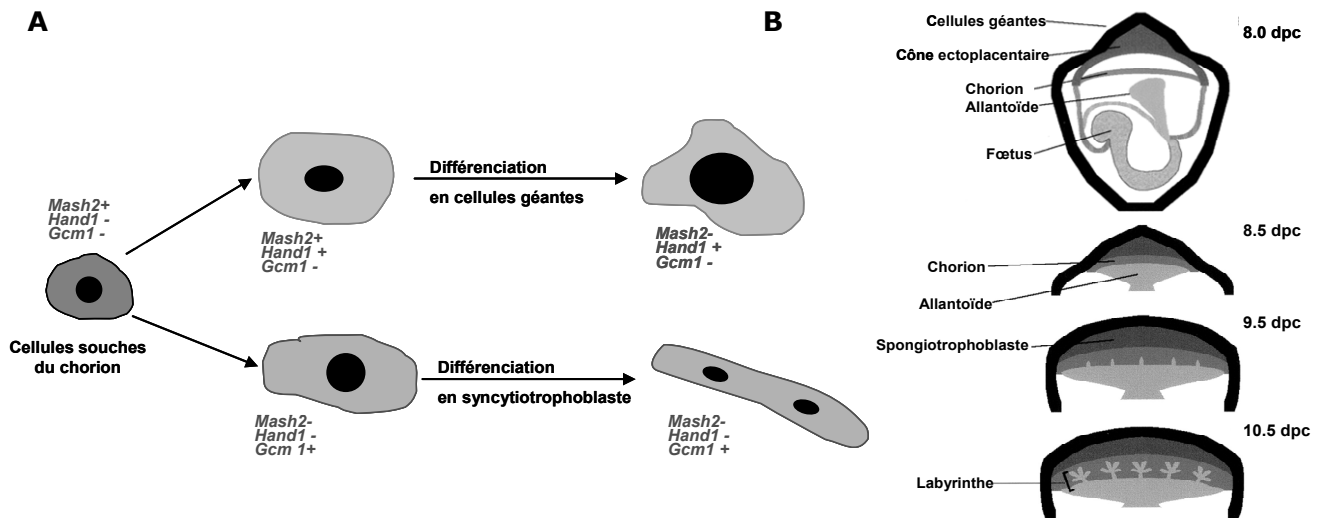


Figure 17 : Différenciation des lignées cellulaires trophoblastiques.

A Expression des facteurs de transcription clés dans les différentes lignées trophoblastiques. (+) indique l'expression du gène, (-) indique l'absence d'expression du gène. **B** Les étapes du développement placentaire en fonction des jours de gestation et formation du labyrinthe par fusion du chorion et de l'allantoïde. D'après (Cross *et al*, 2002a).

2.3.2 Développement placentaire et morphogénèse

Au moment de l'implantation (4.5 jours *post coitum*) les cellules du trophoctoderme qui ne sont pas en contact avec la MCI se différencient en cellules géantes primaires [analogue au cytotrophoblaste extravilleux chez l'humain]. Ces cellules ne se divisent plus mais leur ADN continue sa réplication, et elles deviennent ainsi polyploïdes. Cependant, du côté polaire du blastocyste, c'est-à-dire les cellules du trophoctoderme directement en contact avec la MCI, deux types cellulaires diploïdes se différencient : (1) l'ectoderme extra-embryonnaire donnant naissance au futur chorion qui se développera par la suite en labyrinthe et, (2) le cône ectoplacentaire qui peut se différencier en partie en cellules géantes secondaires et, par la suite, en spongiotrophoblastes (Watson & Cross, 2005).

Vers 8.5 jours *post coitum*, le chorion et l'allantoïde se joignent par un phénomène appelé «attachement chorioallantoïdien». Très rapidement, le chorion forme des villosités, créant un espace dans lequel les vaisseaux sanguins fœtaux se développent à partir de l'allantoïde (Cross *et al*, 2003). Dès lors, les cellules de chorions se différencient en deux types cellulaires trophoblastiques : 1) les cellules multinucléées, formées par la fusion de cellules trophoblastiques, constituent le syncytiotrophoblaste qui entoure les vaisseaux sanguins fœtaux ; 2) les trophoblastes mononucléés, délimitant les sinus sanguins maternels (Figure 18B). Ainsi, les cellules trophoblastiques et les vaisseaux fœtaux forment les branchements du labyrinthe [comparables aux villosités chorioniques chez l'humain]. Ces vaisseaux fœtaux évoluent constamment en taille et en branchement

jusqu'à la naissance des souriceaux aux alentours de 19.5 jours *post coïtum* (Adamson *et al*, 2002) (Figure 18A).

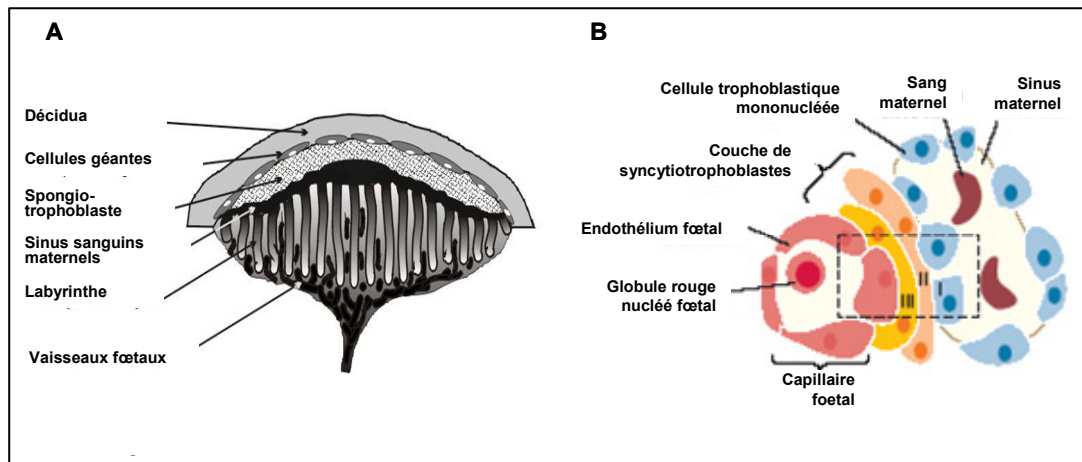


Figure 18 : Le placenta chez la souris. **A** Représentation schématique de l'histologie du placenta murin. **B** Les différentes structures constituant le labyrinthe : sinus sanguins maternels, vaisseaux sanguins fœtaux et les cellules du syncytiotrophoblaste. D'après (Watson & Cross, 2005).

Le labyrinthe représente la surface d'échanges fœto-maternels et est structurellement supporté par le spongiotrophoblaste (Watson & Cross, 2005) (Figure 18A). La taille des sinus maternels délimités par des cellules trophoblastiques diminue en fonction de l'évolution de la gestation. Ceci est dû à la simple augmentation du branchement des cellules trophoblastiques (Adamson *et al*, 2002).

2.3.3 Expression des protéases et des facteurs angiogéniques par les cellules trophoblastiques

2.3.3.1 Les protéases

L'invasion des cellules trophoblastiques est facilitée par la production de protéases qui dégradent la matrice extracellulaire. Cette invasion est en partie contrôlée par des inhibiteurs, synthétisés par le tissu maternel.

Des cultures de blastocystes murins ainsi que des analyses par Northern blot, immunohistochimie ou zymographie sur gel de gélatine, ont montré que les protéases et leurs inhibiteurs présentent un motif d'expression spécifique du type cellulaire. Par exemple, la MMP-9 est spécifiquement exprimée par les cellules géantes. Son expression est détectée vers le 5^{ème} jour *post coïtum*, au moment de l'implantation, et présente un pic aux environs du 9^{ème} jour (période pendant laquelle le placenta se forme et les cellules trophoblastiques sont hautement invasives), puis son expression diminue aux stades plus tardifs (Behrendtsen *et al*, 1992; Alexander *et al*, 1996; Das *et al*, 1997; Leco

et al, 1996). Contrairement à la MMP-9, l'expression de la MMP-2 n'a été démontrée que du côté décidual du placenta (Das *et al*, 1997). L'analyse de l'expression de l'ARNm des MMP-3 et -13 a été également réalisée par Northern blot et a montré que l'expression de ces deux protéases ne varie pas au cours de la gestation, avec une expression plus localisée au niveau du myomètre (Das *et al*, 1997).

Les TIMPs (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases) représentent les inhibiteurs physiologiques des MMPs. L'expression de TIMP-1 semble augmenter entre les jours 5.5 et 9.5 *post coïtum* au niveau de la décidue. Par contre, l'expression de TIMP-2 ne varie pas (Alexander *et al*, 1996).

Plusieurs données montrent que l'activité de la MMP-9, au cours de la placentation, est régulée en partie par le TIMP-3 (Whiteside *et al*, 2001). L'expression de ce dernier est augmentée au niveau de la partie déciduale directement adjacente aux cellules géantes entre les jours 6 et 7 *post coïtum* (Leco *et al*, 1996; Das *et al*, 1997), puis son expression diminue en parallèle avec l'expression de la MMP-9 (Leco *et al*, 1996) contrôlant ainsi l'invasion des cellules géantes.

Gène	10.5 jours	16.5 jours	18.5 jours
MMP-2	+++ Décidue périphérique	++ Décidue	ND
MMP-9	+ Cellules géantes	ND	ND
MMP-11	++ Décidue adjacente au spongiotrophoblaste Cellules géantes	+++ Décidue	+++ Décidue
TIMP-1	++ Décidue périphérique	+ stroma extra-décidual	+ stroma extra-décidual
TIMP-2	++ Décidue périphérique	++ Décidue	+ Décidue + Spongiotrophoblaste
TIMP-3	++ Décidue périphérique Spongiotrophoblaste	++ Spongiotrophoblaste	++ Spongiotrophoblaste

Tableau 5 : Expression des MMPs et des TIMPs durant la seconde partie de la gestation chez la souris. (10.5 – 18.5 jours de gestation) + à +++ indiquent le taux d'expression de l'ARNm de chaque gène. ND : Non Détecté. D'après (Teesalu *et al*, 1999).

Les expressions des MMP-2, -9 et -11, et des TIMP-1, -2 et -3 ont été étudiées durant la seconde partie de la gestation par l'équipe de Teesalu *et al* (1999). L'essentiel de leurs résultats est résumé dans le tableau (Tableau 5).

D'autres facteurs peuvent contrôler l'invasion trophoblastique indirectement en modulant l'expression de certaines MMPs ou en modulant les composants de la matrice extracellulaire. En effet, le TNF α (Tumor Necrosis Factor- α) augmente l'activité gélatinolytique en induisant l'expression de la MMP-9 (Meisser *et al*, 1999). Quant au TGF- β (Transforming Growth Factor- β), il défavorise l'invasion trophoblastique en induisant, d'une part, la synthèse de glycoprotéines (laminine, fibronectine et collagène) par les cellules cytotrophoblastiques, renforçant ainsi la matrice extracellulaire, et d'autre part, en inhibant l'expression de la MMP-9 (Meisser *et al*, 1999).

A côté des MMPs, la dégradation de la matrice extracellulaire fait intervenir une deuxième famille enzymatique, la famille des protéases à sérine, à laquelle appartient le système plasminogène/plasmine qui sera plus détaillé dans le chapitre suivant. L'expression des activateurs du plasminogène de type urokinase (uPA) et tissulaire (tPA), ainsi que l'inhibiteur PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor) de ce système, a été observée au cours de la gestation chez la souris comme chez l'humain. L'uPA est essentiellement exprimé entre les jours 10.5 et 15.5 de gestation au niveau des cellules du spongiotrophoblaste infiltrant la décidue (Teesalu *et al*, 1998). L'expression de l'ARNm de PAI-1 est plus confinée à la zone de jonction entre la décidue et le labyrinthe. En effet, à 10.5 jours de gestation, son expression est localisée au niveau des cellules géantes et à 11.5 jours, elle s'étend au niveau du spongiotrophoblaste non invasif. De même, PAI-1 est exprimé par les cellules trophoblastiques entourant les vaisseaux maternels au niveau du labyrinthe (Teesalu *et al*, 1998).

Les souris déficientes pour l'une ou l'autre des protéases, leurs activateurs ou inhibiteurs, sont fertiles et ne présentent pas d'anomalie de reproduction, suggérant qu'une autre protéase peut prendre le relais afin de compenser la déficience. En effet, une expérience a montré que l'injection des inhibiteurs de MMPs chez des souris déficientes en plasminogène provoque des anomalies sévères au niveau du labyrinthe se traduisant par une réduction de taille et de vascularisation (Solberg *et al*, 2003).

L'uPA, exprimé par les cellules invasives du spongiotrophoblaste, peut contribuer à l'activation du système plasminogène/plasmine qui à son tour dégraderait la fibrine de la matrice extracellulaire créant ainsi des espaces pour le développement du labyrinthe. De même, comme nous le verrons dans le chapitre suivant, l'uPA jouerait un rôle dans la migration cellulaire (Teesalu *et al*, 1998).

Durant la placentation, le système plasminogène/plasmine et les MMPs sont fonctionnellement liés, via la participation de la plasmine dans la conversion des pro-MMPs en MMPs actives.

2.3.3.2 Les facteurs pro- et anti-angiogènes

Au niveau de la décidue, les branchements des artères spiralées diminuent au niveau d'une région appelée «metrial triangle». Ils vont, d'une part, perdre des couches de cellules musculaires lisses et, d'autre part, converger et s'anastomoser pour former un canal sanguin central qui va alimenter le labyrinthe (Adamson *et al*, 2002). Cette partie de la décidue est directement adjacente aux cellules géantes et est caractérisée par une forte infiltration des cellules NK utérines (uNK). Ces cellules uNK jouent un rôle primordial dans la modification de la structure des artères via l'interferon-gamma (Croy *et al*, 2000).

Le passage du sang maternel par les cellules trophoblastiques doit être précédé par une déstabilisation des vaisseaux sanguins. Cette déstabilisation est probablement due au VEGF exprimé par les cellules géantes (Shweiki *et al*, 1993; Cross *et al*, 2002b; Hemberger *et al*, 2003). En effet, en l'absence des angiopoïétines, le VEGF peut déstabiliser les vaisseaux en augmentant leur perméabilité (Yancopoulos *et al*, 2000). En plus du VEGF, les cellules géantes expriment la proliférine (Cross *et al*, 2002b) (Figure 18). Les cellules du spongiotrophoblaste sécrètent des facteurs anti-angiogènes, tels que le récepteur soluble du VEGF, le sFLT1, qui va séquestrer le VEGF et l'empêcher de se lier aux récepteurs membranaires, inhibant ainsi son action. De même, ces cellules expriment la Prp (proliférin-related protéine), une protéine antagoniste de la proliférine (Cross *et al*, 2002b) (Figure 19). Les facteurs anti-angiogènes synthétisés par le spongiotrophoblaste contribueraient à inhiber le développement d'un réseau endothélial maternel excessif au-delà de la décidue (Cross *et al*, 2002b). Afin d'augmenter le flux sanguin et d'alimenter le labyrinthe correctement, les cellules géantes expriment également des facteurs vasodilatateurs, tels qu'eNOS (endothelial Nitric Oxyde Synthase) et Adm (Adrénomedulline) (Cross *et al*, 2002b; Hemberger *et al*, 2003) (Figure 18).

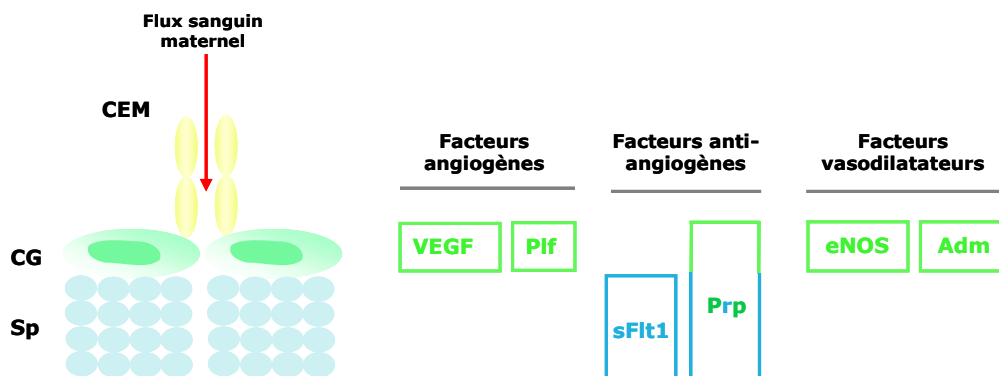


Figure 19 : Expression des facteurs angiogènes et vasoactifs par les cellules trophoblastiques. Adm : Adrénomedulline ; eNOS : endothelial nitric oxide synthase ; Plf : proliférine ; Prp : proliférine related protein ; sFlt1 : soluble Flt1 ; VEGF : vascular endothelial growth factor ; CEM : cellules endothéliales maternelles ; CG : Cellules géantes, Sp : spongiotrophoblaste. D'après (Cross *et al*, 2002b).

3. Métalloprotéases et système plasminogène/plasmine : acteurs au cours de la reproduction

La matrice extracellulaire (MEC) est composée de fibres de collagène, de glycoprotéines et de protéoglycans organisés de façon structurale, exerçant un rôle physique de support pour le tissu. Ces molécules peuvent également jouer un rôle biochimique de signalisation, telle que l'endostatine. Au sein de la matrice extracellulaire sont séquestrés des facteurs de croissance et des inhibiteurs souvent liés aux composants matriciels, tels que les collagènes. Le remaniement de cette matrice est indispensable au cours de divers phénomènes physiologiques, tels que le développement embryonnaire et la reproduction, mais également, au cours de processus pathologiques tels que la progression tumorale. Ce remodelage est assuré par plusieurs enzymes matricielles, telles que les protéases à sérine et les métalloprotéases, deux familles d'enzymes auxquelles nous nous intéresserons particulièrement au cours de ce chapitre.

3.1 Les métalloprotéases (MMPs)

La première activité collagénolytique a été observée par Gross et Lapière en 1962, lors de l'étude de la maturation d'une queue de têtard (GROSS & Lapiere, 1962). Depuis cette découverte, 24 enzymes dénommées métalloprotéases (MMPs), codées chacune par un gène différent ont été identifiées et forment la famille des métalloprotéases matricielles (Puente *et al*, 2003).

Les MMPs partagent plusieurs caractéristiques: (1) la présence d'un atome de zinc dans leur site actif, (2) elles sont synthétisées sous une forme inactive, (3) pour la majorité d'entre elles, une activation est requise au niveau de l'espace extracellulaire, (4) leur capacité à cliver la majorité des composants de la matrice extracellulaire, et (5) leur action protéolytique est inhibée soit par l' α 2-macroglobuline, soit par des inhibiteurs spécifiques: TIMPs (Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases) (Curry, Jr. & Osteen, 2003).

3.1.1 Structure et classification des MMPs

Les MMPs ont été précédemment classées selon leur affinité pour le substrat. Cependant, cette classification fonctionnelle est maintenant remplacée par une classification structurale (Curry, Jr. & Osteen, 2003; Folgueras *et al*, 2004).

Ces protéases se composent de différents domaines conservés, agencés de la manière suivante depuis la région N-terminale vers la région C-terminale (Figure 20) :

- Un peptide signal, appelé pré-domaine, qui est directement éliminé lors de la sécrétion de l'enzyme ;
- Un pro-domaine nécessaire pour maintenir l'enzyme à l'état latent. En effet, ce domaine contient une séquence Pro-Arg-Cys-Gly-His-X-Pro-Asp permettant le «cystéin switch». La cystéine de ce propeptide est le quatrième ligand de l'ion Zinc du domaine catalytique, et l'hydrolyse de ce lien permet l'activation de la molécule (Figure 20) (Sternlicht & Werb, 2001).
- Un domaine catalytique contenant le site de fixation du Zinc et une structure peptidique comportant un résidu méthionine conservé, et appelé «Met-turm».
- Un domaine de type «hémopexine» lié au domaine catalytique par une région charnière riche en proline («hinge region»). Ce domaine contribue à la spécificité pour le substrat et permet l'interaction avec d'autres protéines, telles que des intégrines et des récepteurs de surface cellulaire.

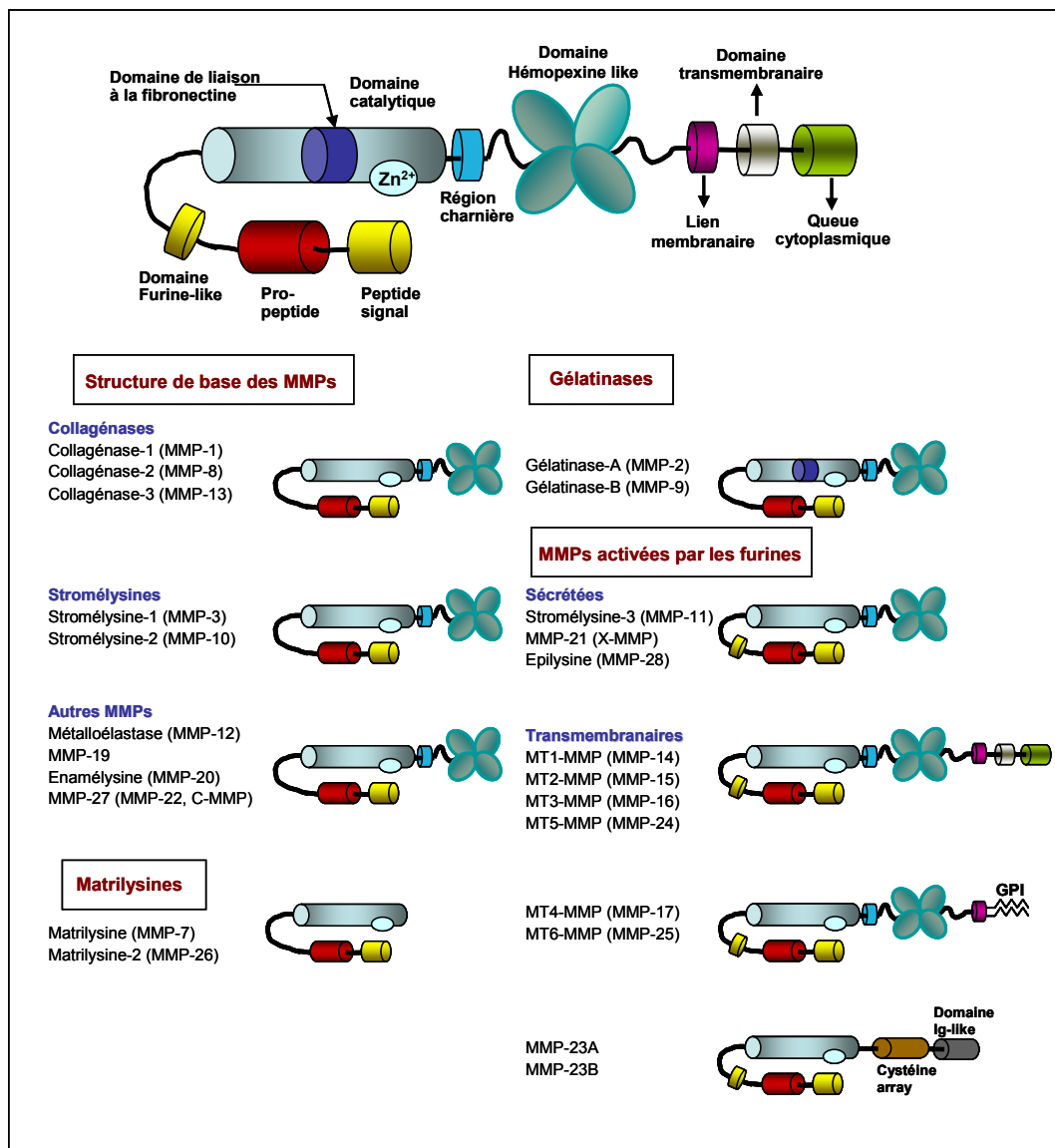


Figure 20 : Classification structurelle des métalloprotéases. D'après (Folgueras et al, 2004)

Cette architecture de base est présente dans un sous-groupe de protéases sécrétées composé de 3 collagénases (MMP-1, -8, -13), de 2 stromélysines (MMP-3 et -10), et de 4 MMPs supplémentaires présentant d'autres caractéristiques structurales supplémentaires (MMP-12, -19, -20 et -27). Les matrilysines (MMP-7 et -26) diffèrent de ses consoeurs par l'absence du domaine hémapexine C-terminal. Le troisième groupe représenté par les gélatinases A et B (MMP-2 et -9, respectivement) incorpore en plus, dans le domaine de liaison catalytique, 3 répétitions de type fibronectine de type II, permettant ainsi la liaison au collagène. Le quatrième groupe comprend des MMPs possédant, entre le pro-peptide et le domaine catalytique, une séquence de reconnaissance pour des protéases à sérine de type «*Furin*», ce qui permet l'activation intracellulaire de ces proenzymes. Ce groupe est constitué des MMP-11, -21 et -28, avec une particularité pour la MMP-21, qui possède un domaine supplémentaire de liaison à la vitronectine dans le domaine catalytique.

Toutes les MMPs décrites ci-dessus présentent la caractéristique commune d'être sécrétées dans le milieu extracellulaire. Par contre, au sein du quatrième groupe (MMPs activées par la furine), on distingue en plus des protéases sécrétées, des protéases liées à la membrane cytoplasmique. Cet ancrage peut se faire, soit par un domaine transmembranaire (MMP-14, -15, -16 et -24), soit par un lien glycosyl phosphatidyl inositol (GPI) (MMP-17 et -25). Les MMP-23 A et B, nommées MMPs transmembranaires de type II, représentent une catégorie particulière de MMPs liées à la membrane par la présence d'un signal d'ancrage N-terminal, d'un domaine riche en cystéine suivi d'un domaine de type «*immunoglobulin-like*» dans la région C-terminale.

3.1.2 Régulation de l'activité des MMPs

Le rôle prépondérant joué par cette famille de MMPs au cours de nombreux processus biologiques implique que leur activité doit être finement modulée. Différents niveaux de régulation sont impliqués dans le contrôle de cette activité.

3.1.2.1 Régulation transcriptionnelle

Plusieurs données indiquent que l'expression des MMPs est régulée au niveau transcriptionnel. En effet, les promoteurs de plusieurs d'entre elles présentent des éléments *cis* permettant la régulation de l'expression des gènes par divers activateurs, tels que AP-1 (activator protein-1), PEA-3 (Polyomavirus enhancer activator-3), Sp-1 (binding site-1), β -caténine/Tcf-4 et NF- κ B (nuclear factor κ B).

Basés sur la composition des éléments *cis*, les promoteurs peuvent être répartis en 3 catégories (Yan & Boyd, 2007).

(1) La majorité des MMPs comporte un promoteur appartenant au premier groupe, qui contient une séquence TATA et un site de liaison AP-1 (*activator protein*).

(2) Le second groupe présente aussi des promoteurs avec une séquence TATA mais sans site de liaison pour AP-1. Ce groupe est constitué de la MMP-8, -11 et -21.

(3) Le troisième groupe, incluant la MMP-2, -14, et -28, ne présente pas de séquence TATA, ainsi la transcription de ces gènes peut être initiée au niveau de plusieurs sites. L'expression des MMPs de ce groupe est majoritairement régulée par le facteur de transcription Sp-1 qui se lie à une séquence riche en GC. Généralement, ces MMPs sont exprimées de façon constitutive comme les gènes «*house keeping*» et sont faiblement induites par des facteurs de croissance ou par des cytokines (Yan & Boyd, 2007).

Le complexe nucléaire AP-1, formé des produits de deux oncogènes de réponse précoce *c-fos* et *c-jun*, est sensible à la variation des taux des trans-activateurs. En effet, une large variété de cytokines et de facteurs de croissance, tels que des interleukines, les interférons, l'EGF (epidermal growth factor), le bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), le PDGF (Platelet Derived Growth Factor), le TNF α (Tumor Necrosis Factor- α) et le TGF β (Tumor Growth Factor- β) modulent l'expression de plusieurs MMPs par l'intermédiaire de jun/fos et AP-1 (Sternlicht & Werb, 2001; Chakraborti *et al*, 2003).

D'autres domaines, tels que des sites de liaison pour le facteur de transcription NF- κ B (présent dans le promoteur de MMP-9), et les éléments de réponse au TGF- β (TIE: TGF β Inhibitor Element), présents au niveau des promoteurs des MMP-1, -3, -7, -9, -19 et MT1-MMP, participent également au contrôle de l'activité transcriptionnelle de ces promoteurs.

3.1.2.2 Régulation de l'activation

Les MMPs sont sécrétées sous forme latente inactive, pro-MMP, et dans la majorité des cas, elles sont activées dans le milieu extracellulaire. Le caractère zymogénique des pro-MMPs est conféré par une séquence de huit résidus conservés dans la partie C-terminale du pro-domaine, appelée «cysteine switch». Dans la forme latente des pro-MMPs, le pro-peptide se replie et se lie au zinc du site catalytique par le soufre de la fonction thiol de la cystéine. Le zinc du site actif est par ailleurs coordonné aux 3 résidus histidine de la séquence consensus **HEXXHXXGXXH** du domaine catalytique. La scission protéolytique ou la déstabilisation du propeptide entraîne la rupture de la liaison thiol-zinc (et l'hydratation du zinc), ce qui active les pro-MMPs (Figure 21) (Springman *et al*, 1990; Chakraborti *et al*, 2003).

Cependant, certaines MMPs, telles que la MMP-11 et les MT-MMPs, possédant un site de liaison à la furine, présentent un modèle d'activation protéolytique distinct. En

effet, ces MMPs sont activées par la furine au niveau de l'appareil de Golgi et, par conséquent, atteignent le compartiment extracellulaire à l'état actif. Cette activation intracellulaire s'effectue par une attaque protéolytique au niveau de la région C-terminale du pro-domaine, résultant en l'élimination complète de ce dernier.

La MMP-2 est réfractaire à l'activation par le système classique des autres MMPs. En effet, elle est activée via un réseau exigeant la contribution de la MT1-MMP (MMP-14) et le TIMP-2 (Strongin *et al*, 1995).

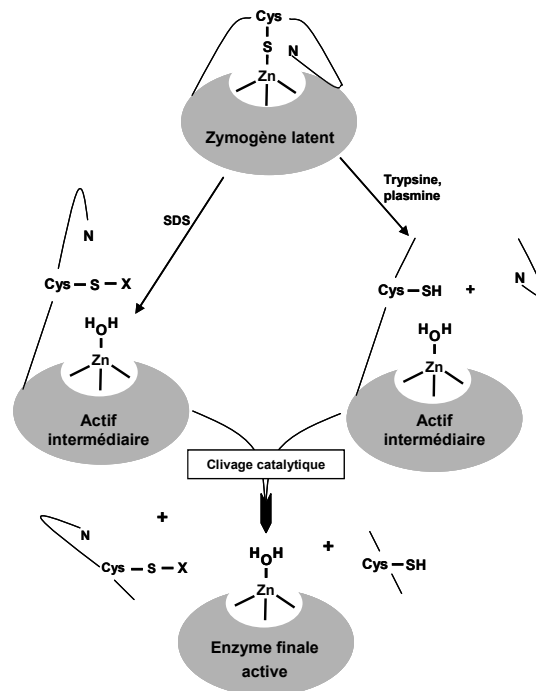


Figure 21 : Mécanisme du «cystéine switch» dans l'activation des MMPs.

La latence des proMMPs est conférée par la liaison de la cystéine du « cystéine switch » au zinc catalytique. L'activation des proMMPs qui conduit à l'hydratation du zinc catalytique, peut résulter d'un changement conformationnel induit par des agents dénaturants comme les détergents (SDS). Alternativement, des protéases peuvent cliver une partie du propeptide en amont de la cystéine. Dans un deuxième temps, ces intermédiaires actifs subissent un clivage protéolytique entraînant la perte du propeptide et donc, une activité permanente des MMPs. SDS : dodécylsulfate de sodium. APMA : acétate 4-aminophénylmercurique. D'après (Springman *et al*, 1990;Chakraborti *et al*, 2003).

3.1.2.3 Inhibition des MMPs actives

Les MMPs sont régulées au niveau de leur synthèse et de leur activation. Dans le milieu extracellulaire, leur activité est également rigoureusement contrôlée par des inhibiteurs. Ces inhibiteurs sont soit tissulaires, c'est le cas des TIMPs (Tissue Inhibitors of Metalloproteases), soit présents dans le plasma et les fluides tissulaires, c'est le cas de l' α 2-macroglobuline (Curry, Jr. & Osteen, 2003).

Les TIMPs sont des glycoprotéines de 20 à 29 kDa (selon le nombre de sites de glycosylation) qui inhibent de manière réversible le domaine catalytique des MMPs dans

un rapport équimolaire 1:1. Actuellement, 4 TIMPs ont été décrits. Les TIMP-1,-2 et -4 sont sécrétés dans le milieu extracellulaire, tandis que le TIMP-3 est ancré à la matrice extracellulaire (Leco *et al*, 1994).

L'inhibition des MMPs par les TIMPs se produit par l'interaction de la région N-terminale des TIMPs avec le site catalytique des MMPs.

De façon générale, tous les TIMPs sont capables d'inhiber toutes les MMPs, néanmoins, des affinités plus au moins fortes sont observées entre certains TIMPs et MMPs. Par exemple, le TIMP-2 présente une forte affinité pour la MMP-2, tandis que le TIMP-1 se lie préférentiellement à la MMP-9. De même, il a été démontré *in vitro* que le TIMP-3 se lie non seulement avec une forte affinité à la MMP-9, mais également à la MT1-MMP, contrairement au TIMP-1 qui ne peut pas agir sur les MT1- et MT3-MMPs (Will *et al*, 1996; Shimada *et al*, 1999).

En plus de leur activité principale qui est l'inhibition des MMPs, les TIMPs peuvent également avoir d'autres actions biologiques, telles que la prolifération et la croissance cellulaires de plusieurs lignées cancéreuses (Bertaux *et al*, 1991; Hayakawa *et al*, 1994; Baker *et al*, 1998). TIMP-3 peut également induire l'apoptose de diverses lignées cellulaires cancéreuses (Smith *et al*, 1997; Baker *et al*, 1998; Baker *et al*, 1999).

Contrairement aux TIMPs dont l'inhibition est réversible, l' α 2-macroglobuline inhibe les MMPs en provoquant l'internalisation du complexe α 2-macroglobuline/MMP par endocytose et inactivation des MMPs de façon irréversible (Sternlicht & Werb, 2001).

D'autres inhibiteurs de MMPs ont été découverts. Parmi eux, le TFPI-2 (Tissue Factor Pathway Inhibitor-2) a été décrit comme capable d'inhiber les gélatinases et les collagénases (Herman *et al*, 2001). RECK (REversioin inducing Cystein riche protein with Kasal motifs) est une glycoprotéine qui a la capacité d'inhiber principalement les MMP-2, MMP-9 et MT1-MMP. RECK est aujourd'hui considéré comme un agent thérapeutique potentiel dans de nombreux cancers puisqu'il réduit l'angiogenèse et l'invasion tumorales (Clark *et al*, 2007).

3.1.3 MMPs et endomètre humain

3.1.3.1 Expression et origine cellulaire des MMPs dans l'endomètre humain

Les métalloprotéases matricielles sont généralement associées aux menstruations où elles participent activement à l'élimination de la couche fonctionnelle de l'endomètre. Cependant, certaines MMPs jouent également un rôle au cours des différents remodelages qui se produisent durant les phases proliférative et sécrétoire.

Globalement, la majorité des MMPs sont sécrétées par les cellules stromales (MMP-1, -2, -3, -9, -10, -11 et MT1-MMP) (Rodgers *et al*, 1994). Cependant, les MMP-7 et -26 (matrilysines 1 et 2) sont spécifiquement exprimées par les cellules épithéliales. En effet, la MMP-7 a été identifiée au niveau de ces cellules durant les menstruations et en début de la phase proliférative (moment de la régénération de l'épithélium de surface), mais également de façon localisée au niveau des structures glandulaires en élongation (Rodgers *et al*, 1993). De même, la MMP-26 (ou endométase) est exprimée par les cellules épithéliales et également par les cellules endothéliales entre la phase mi-proliférative et mi-sécrétoire (Pilka *et al*, 2006). Contrairement à la MMP-7 qui est exclusivement épithéliale, la MMP-9 est exprimée par différents types cellulaires au niveau de l'endomètre, à savoir, les cellules stromales, immunitaires et endothéliales (Vincent *et al*, 1999) (Figure 22). Durant la phase menstruelle, les leucocytes représentent une source principale de MMPs (MMP-1, -2, -8, -9, -12 et -14) (Salamonsen *et al*, 2002; Pilka *et al*, 2004). La sécrétion de ces MMPs par les différentes cellules immunitaires est détaillée dans le tableau 3 (chapitre II, 1.2 Cycle menstruel).

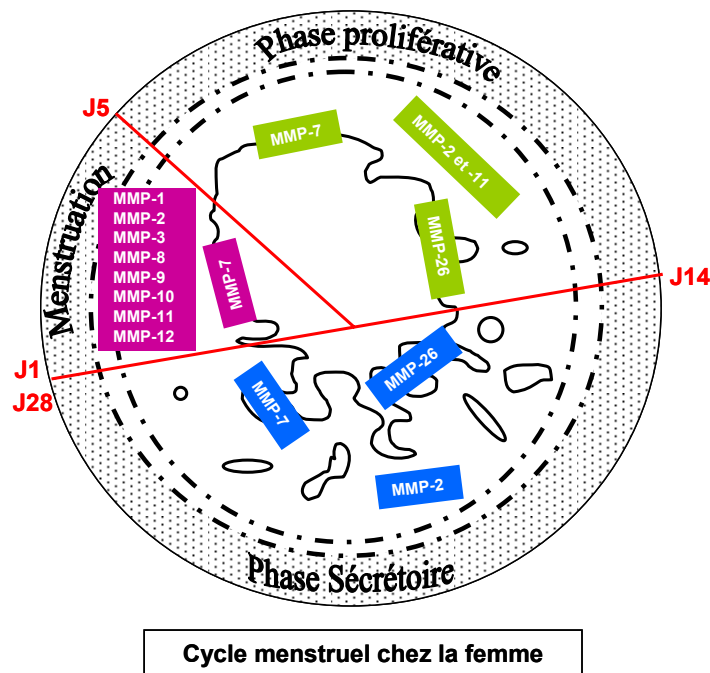


Figure 22 : Description schématique de l'expression et de la localisation des MMPs au cours du cycle menstruel chez la femme. Adapté de (Hulboy *et al*, 1997) et modifié selon (Rodgers *et al*, 1994; Goffin *et al*, 2003; Pilka *et al*, 2004; Pilka *et al*, 2006).

La protéolyse de l'endomètre est majoritairement contrôlée par les inhibiteurs tissulaires des MMPs, les TIMPs. La majorité des données de la littérature converge vers une régulation réduite de TIMP-1 et -3 durant les phases proliférative et sécrétoire suivie d'une augmentation de l'expression durant la phase menstruelle (Hampton &

Salamonsen, 1994;Zhang & Salamonsen, 1997;Freitas *et al*, 1999;Goffin *et al*, 2003;Maatta *et al*, 2000). Cependant, des controverses existent concernant l'expression de TIMP-2. Des équipes montrent qu'elle ne présente aucune variation au cours du cycle (Hampton & Salamonsen, 1994b;Goffin *et al*, 2003), tandis que les travaux de Freitas démontrent une augmentation de son expression durant les menstruations (Freitas *et al*, 1999). La concentration en ARNm codant pour TIMP-4 ne varie pas au cours du cycle et est faiblement exprimé par les cellules stromales. Cependant, par immunohistochimie, il a été démontré que la protéine est exclusivement épithéliale et est présente au niveau des sécrétions glandulaires (Pilka *et al*, 2006).

3.1.3.2 Régulation de l'expression des MMPs au niveau de l'endomètre humain

L'expression des MMPs et de leurs inhibiteurs est contrôlée par les hormones stéroïdiennes. Cette régulation est réalisée primordialement via AP-1, facteur de transcription qui régule l'expression d'une grande variété de MMPs. En effet, diverses études ont montré que durant la phase proliférative, moment de l'augmentation de l'œstradiol, le ligand se lie à son ER et induit via ERE, l'expression des facteurs de transcription *jun* et *fos* (Kushner *et al*, 2000) qui, à leur tour, vont se lier au site de liaison de AP-1 présent au niveau du promoteur des MMPs. Ainsi, l'œstradiol contrôlerait l'expression de diverses MMPs indirectement *via jun* et *fos*. Durant la phase sécrétoire, la progestérone (P_4) influence plusieurs mécanismes, moléculaires afin de limiter l'expression des MMPs. Parmi ces mécanismes on retrouve la modulation de l'expression d'AP-1 comme c'est le cas pour l'œstradiol (E_2). Il a été démontré que chez des souris traitées à l' E_2 , on observait une augmentation de l'expression de *c-fos* au niveau de l'utérus. Cette augmentation est inhibée par l'ajout de P_4 (Kirkland *et al*, 1992).

Les hormones peuvent également contrôler indirectement l'expression des métalloprotéases par l'intermédiaire de cytokines et de facteurs de croissance qui peuvent soit inhiber, soit stimuler l'expression de MMPs. En effet, la progestérone stimule l'expression de TGF- β qui, en se liant à TIE (TGF- β Inhibitory Element), inhibe la transcription du gène codant pour la MMP-7 (Schroen & Brinckerhoff, 1996).

La culture de cellules stromales endométriales en présence de IL-1 et TNF- α stimule l'expression de la MMP-1, -3 et -9 mais pas celle de la MMP-2 (Rawdanowicz *et al*, 1994). Ce contrôle est réalisé via AP-1 qui est absent au niveau du promoteur de la MMP-2. A l'opposé, la présence de progestérone dans des milieux de culture inhibe la sécrétion de MMP-1 et -3 indirectement via l'inhibition d'IL-1 α (Singer *et al*, 1997;Keller *et al*, 2000). De même, le modèle de culture d'explant d'endomètre montre que ces derniers produisent les MMP-1, -2 et -9. Cette synthèse est abolie par l'ajout de progestérone (Marbaix *et al*, 1992). En résumé, durant la phase proliférative, l'œstradiol stimule

l'expression des MMPs qui vont contribuer à la réparation du tissu endométrial après les menstruations, de même qu'au remodelage de la matrice extracellulaire, au développement des vaisseaux sanguins et à la prolifération glandulaire. Durant la phase sécrétoire, la progestérone maintient l'intégrité du tissu en régulant négativement les MMPs. La chute des hormones stéroïdiennes enclenche toute la cascade des MMPs conduisant à la perte de la couche fonctionnelle de l'endomètre.

3.2 Le système plasminogène/plasmine

Le système fibrinolytique joue un rôle important dans la dégradation de la matrice extracellulaire, dans l'activation des formes latentes des MMPs et dans le relargage de facteurs de croissance par la dégradation de protéines matricielles. La plasmine est l'un des principaux acteurs de ce système. Elle est sécrétée par les cellules hépatiques dans la circulation sanguine sous une forme latente, le plasminogène, qui sera ensuite activé par clivage grâce aux activateurs du plasminogène de type urokinase (uPA) ou de type tissulaire (tPA). L'activité protéolytique de la plasmine est directement régulée par l' α 2-antiplasmine ou indirectement *via* les inhibiteurs des activateurs du plasminogène (PAIs), dont le plus important est celui de type I (PAI-1).

3.2.1 La plasmine

La plasmine est une protéase à sérine de 66 kDa composée de deux chaînes polypeptidiques reliées par un pont disulfure. La chaîne B en position C-terminale contient le domaine sérine protéase responsable de l'activité enzymatique, et celui de liaison des inhibiteurs. La chaîne A, en position N-terminale, contient 5 domaines «kringle» (Andreasen *et al*, 1997). Elle est sécrétée sous forme d'un pro-enzyme de 92kDa, le plasminogène (Plg), qui contient une activité 100 fois moins importante que celle de la plasmine. La conversion du plasminogène en plasmine se produit par le clivage entre une arginine en position 561 et une valine en position 562 (Andreasen *et al*, 1997). La plasmine est essentiellement reconnue pour son rôle dans l'hémostase.

En effet, il s'agit d'une enzyme protéolytique très puissante qui dégrade le caillot de fibrine pouvant se former dans les vaisseaux sanguins. La plasmine peut dégrader les glycoprotéines et les protéoglycans de la matrice extracellulaire et de la membrane basale (laminine, fibronectine, vitronectine et collagène). Cette dégradation est induite directement ou par l'activation indirecte de certaines pro-MMPs, telles que la MMP-1, -3, -9, -10 et -13 (Lijnen, 2002). Elle contribue également au relargage de certains facteurs de croissance séquestrés dans la matrice extracellulaire tels que le TGF- β et le VEGF-A (Khalil *et al*, 1996; Rifkin *et al*, 1999) (Figure 23).

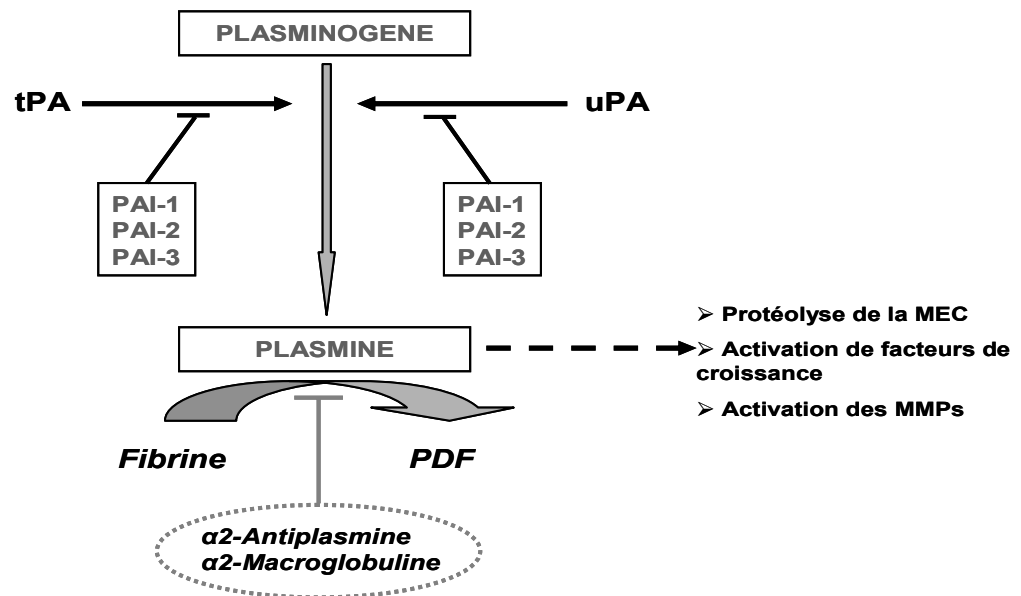


Figure 23 : Représentation schématique du système plasminogène/plasmine.

MEC : matrice extracellulaire ; tPA : activateur du plasminogène de type tissulaire ; uPA : activateur du plasminogène de type urokinase ; PAI : Inhibiteur de l'activateur du plasminogène ; PDF : produit de dégradation de la fibrine.

3.2.1.1 Les activateurs du plasminogène

a) L'activateur du plasminogène de type tissulaire (tPA)

Le tPA est une sérine protéase synthétisée par les cellules endothéliales et relarguée dans la circulation sanguine sous forme de précurseur constitué d'une simple chaîne peptidique (sc-tPA « single chain tPA ») de 527 acides aminés (70 kDa). L'hydrolyse du lien peptidique, par la plasmine, entre l'arginine en position 275 et l'isoleucine en position 276, permet la conversion en une double chaîne de tPA (reliée par un pont disulfure) (Lijnen, 2001; Gilabert-Estelles *et al*, 2005). Le tPA est constitué de 4 domaines contenant, de la région amino-terminale vers la région carboxy-terminale: (1) résidus 4→ 50: un domaine homologue au domaine «en doigt» de la fibrine favorisant son affinité à la fibronectine; (2) résidus 50→ 87: un domaine homologue à l'épidermal growth factor (EGF); (3) résidus 87-276: comprenant 2 domaines «kringle»; (4) résidus 276-527 : le domaine de type sérine protéase conférant l'activité enzymatique (Lijnen, 2001).

Le tPA est l'activateur fibrinolytique primaire. Sa liaison à la fibrine augmente la conversion du plasminogène en plasmine.

b) L'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) et son récepteur (uPAR)

L'uPA est une protéase à sérine de 53 kDa (411 acides aminés), traduite sous forme d'une pro-enzyme inactive constituée d'une simple chaîne polypeptidique (scuPA pour «*single chain uPA*»). Sa conversion en forme active implique un clivage entre la lysine en position 158 et l'isoleucine en position 159. Suite à ce clivage, les deux chaînes de la forme active (tcuPA pour «*two chain uPA*») restent liées par un pont disulfure entre les cystéines 148 et 279 (Lijnen, 2001). La chaîne A contient un domaine de type «facteur de croissance» et un domaine «kringle», tandis que les sites catalytiques et de liaison aux inhibiteurs sont localisés sur la chaîne B (Andreasen *et al*, 1997). L'activation de la scuPA est principalement induite par la plasmine. Or, l'uPA active la conversion du plasminogène en plasmine. Ce mécanisme d'activation en boucle permet donc à la plasmine d'amplifier sa propre production. Divers facteurs peuvent également cliver la forme inactive de l'uPA, *in vitro*, tels que le facteur de coagulation XIIa, la cathepsine B et la cathepsine L (Andreasen *et al*, 1997).

L'activation de l'uPA nécessite son interaction avec son récepteur uPAR (ou CD87), exprimé à la surface d'un grand nombre de types cellulaires (monocytes, cellules endothéliales et musculaires lisses et cellules trophoblastiques). L'uPAR est une protéine glycosylée d'environ 55 kDa (313 acides aminés) qui est ancrée à la membrane plasmique par un ancrage glycosyl-phosphatidyl-inositol (PGI) (Myohanen & Vaheri, 2004).

L'emplacement de l'uPAR à la surface cellulaire permet de contrôler la protéolyse extracellulaire lors de la migration cellulaire. L'uPAR possède d'autres ligands que l'uPA. Notamment, il se lie avec une forte affinité à la vitronectine (VN) afin de permettre l'adhésion des cellules (Parfyonova *et al*, 2002). Cette liaison est stimulée par le pro-uPA, l'uPA et le complexe uPA/PAI-1, tandis qu'elle est inhibée par PAI-1.

3.2.2 Les inhibiteurs du système plasminogène/plasmine

L'inhibition du système plasminogène/plasmine s'effectue soit par l'inhibition des activateurs du plasminogène par le Plasminogen inhibitor activator (PAI), soit par l'inactivation de la plasmine par l' α 2-antiplasmine ou l' α 2-macroglobuline.

3.2.2.1 Les inhibiteurs des activateurs du plasminogène (PAIs)

Il existe 3 types de PAI (1, 2 et 3), appartenant à la famille des «serine protease inhibitor» ou SERPINS. Ces SERPINS présentent en commun un domaine structural d'inhibition des protéases. Ce domaine forme une boucle réactive centrale (**RCL**: *reactive*

central loop) contenant un lien peptidique (P1-P1') jouant un rôle de pseudo-substrat pour les protéases cibles.

(a) PAI-1

Structure de PAI-1

PAI-1 est un inhibiteur protéolytique à plusieurs fonctions. En effet, il est reconnu comme étant le régulateur primaire de la fibrinolyse, mais il joue également un rôle important dans l'adhérence et la migration cellulaire (Harbeck *et al*, 2001). PAI-1 est une simple chaîne glycoprotéique de 52 kDa (379 acides aminés). Il est synthétisé par plusieurs types cellulaires, tels que les mégacaryocytes, les cellules endothéliales et notamment par l'endomètre humain (Gilbert-Estelles *et al*, 2005). Dans les conditions physiologiques, sa source principale provient des plaquettes.

PAI-1 se lie rapidement aux tPA simple et double chaînes ainsi que l'uPA double chaîne, mais ne se lie pas à l'uPA simple chaîne.

Liaison de PAI-1 aux activateurs du plasminogène et à la vitronectine

Appartenant aux SERPINS, PAI-1 présente la même architecture que les différents membres de cette famille d'inhibiteurs de protéases. Sa structure tertiaire comporte 3 feuillets β (A, B et C), 9 hélices α et la boucle réactive centrale (**RCL**) qui contient le site réactif Arginine₃₄₆-Méthionine₃₄₇ afin de cibler les protéases à sérine. Les résidus réactifs Arginine₃₄₆-Méthionine₃₄₇ sont désignés P1-P1' au niveau de RCL. PAI-1 inhibe l'activateur du plasminogène (PA) en formant un complexe covalent bloquant ainsi l'interaction de PA avec son substrat spécifique (Lee CC & Huang TS, 2005).

En fonction de sa liaison ou pas à l'activateur du plasminogène (PA), PAI-1 peut se présenter sous 3 formes différentes : PAI-1 est synthétisé sous une **forme inhibitrice active** où la boucle réactive (RCL), exposée à la surface de la molécule, est accessible pour les protéases (Figure 24 A). Cependant, cette conformation est instable (demi-vie inférieure à 1 heure) et se transforme spontanément en une **forme inactive latente** très stable (Figure 23C). Dans cette forme, la RCL est à l'intérieur du feuillet β , la rendant inaccessible aux protéases cibles. Cette conversion structurale est réversible. Une fois le complexe PAI-1/PA formé, le lien P1-P1' du RCL est clivé et est immédiatement suivi d'une insertion du complexe P1-PA à l'intérieur du feuillet β . Ceci induit la distorsion de la protéase et inhibe son activité catalytique. On parle alors de la **forme clivée** de PAI-1 (Figure 24 B).

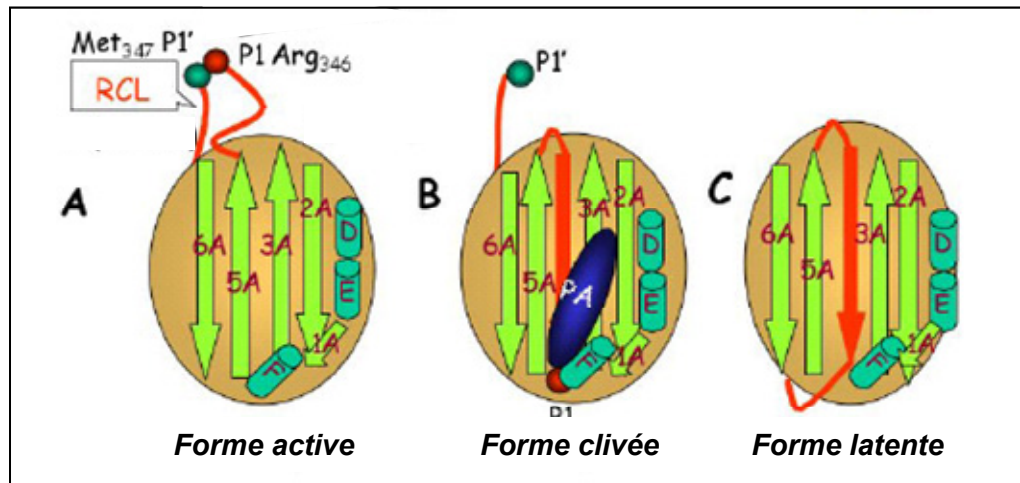


Figure 24 : Structure de PAI-1 et son interaction avec les activateurs du plasminogène. D'après (Lee CC & Huang TS, 2005).

Le rôle de PAI-1 dans le système fibrinolytique est assuré par son interaction avec les activateurs du plasminogène. Cependant, il a été démontré que PAI-1 peut se lier à d'autres ligands qui déterminent d'autres fonctions biologiques (physiologiques et pathologiques). Parmi ces ligands, la vitronectine est la plus étudiée. La vitronectine est un composant de la matrice extracellulaire et un récepteur de surface spécialisé dans l'endocytose. Il s'agit d'une glycoprotéine de 78 kDa (459 acides aminés) produites par le foie. La vitronectine se compose des domaines suivant depuis la région N-terminale: un domaine somatomédine B (SMB), une séquence RGD d'interaction avec les intégrines, 2 domaines «*hemopexine like*» et un domaine de liaison à l'héparine (Andreasen *et al*, 1997) (Figure 25). La vitronectine plasmatique présente une conformation dite «fermée» tandis qu'au niveau de la matrice extracellulaire, elle se présente en conformation «ouverte» (Hess *et al*, 1995).

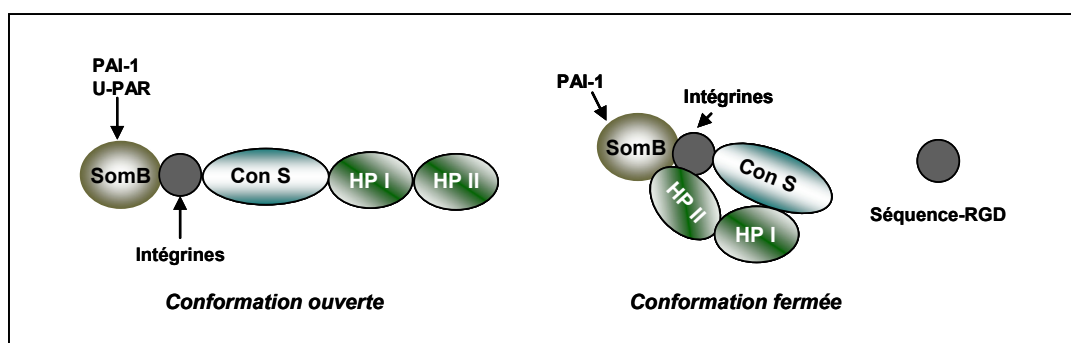


Figure 25 : Représentation schématique de la vitronectine. Représentation des différents domaines composant la vitronectine ainsi que les deux conformations qu'elle peut adopter en fonction qu'elle est plasmique ou tissulaire. D'après (Andreasen *et al*, 1997).

Le domaine SMB lie le PAI-1 mais également l'uPAR. Leurs deux domaines de liaison à SMB ne sont pas identiques mais se chevauchent. Ainsi, en fonction de la présence d'une ou l'autre molécule, la cellule va adhérer à la matrice ou s'en détacher (Lee CC & Huang TS, 2005) (Figure 26). En effet, en l'absence de PAI-1, la liaison du complexe uPA/uPAR au domaine somatomédine B et/ou des intégrines à la séquence RGD de la vitronectine favorise l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire (Figure 26 A). Par contre, lorsque PAI-1 est présent dans l'environnement péricellulaire, le domaine somatomédine B se lie avec une plus grande affinité à PAI-1 qu'à l'uPAR. La formation de ce complexe PAI-1/ vitronectine entraîne 2 effets :

- (i) il permet la stabilisation de PAI-1 sous une forme active inhibitrice de l'uPA et tPA, ce qui entrave la dégradation de la matrice extracellulaire dont la vitronectine elle-même, et par conséquent, la migration cellulaire (Ciambrone & McKeown-Longo, 1990);
- (ii) il empêche l'adhésion cellulaire induite par l'interaction vitronectine-uPA et/ou vitronectine-intégrines, favorisant dès lors la migration cellulaire (Deng *et al*, 2001).

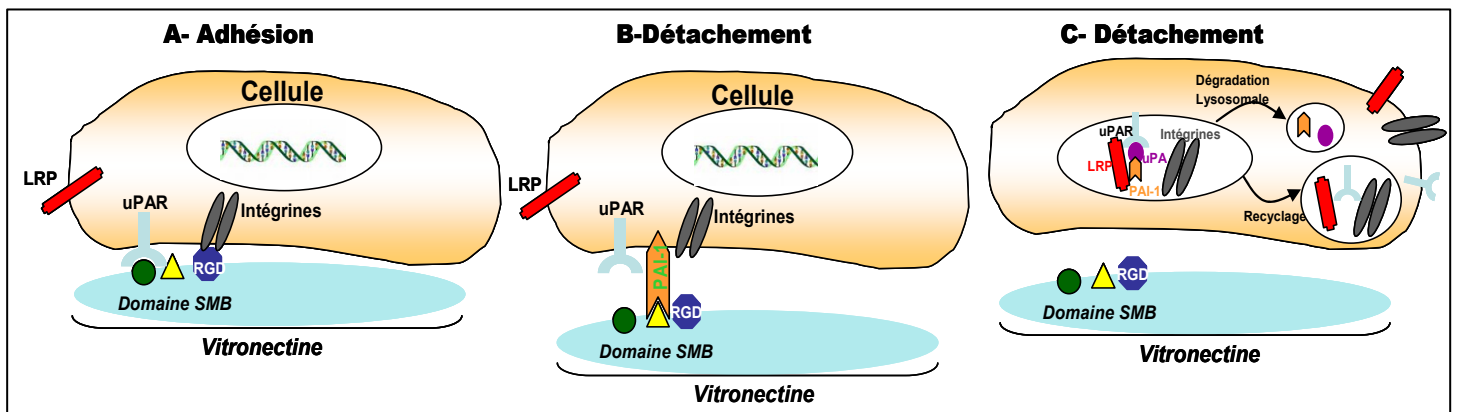


Figure 26 : Illustration de l'implication de PAI-1 dans l'adhésion (A) et le détachement (B) cellulaire dépendant de la vitronectine.

- (A) l'adhésion cellulaire est induite suite à des interactions entre les récepteurs membranaires (intégrines et uPAR) et la vitronectine. L'uPAR lie la vitronectine au niveau du domaine SMB, tandis que les intégrines se lient à la séquence RGD.
 - (B) La présence de PAI-1 provoque le détachement cellulaire. De par une affinité plus grande du domaine SMB de la vitronectine pour PAI-1 que pour l'uPAR, PAI-1 empêche la liaison de l'uPAR à la vitronectine. LRP: Low density lipoprotein receptor-related protein.
 - (c-) PAI- 1 peut se lier au complexe uPA/uPAR. Cette liaison augmente l'affinité de PAI-1 au LRP. En ce liant à des récepteurs d'endocytose, le complexe PAI-1/uPA/uPAR est endocyté et PAI-1 et uPA sont dégradés par les enzymes lysosomales.
- Illustration modifiée d'après (Lee CC & Huang TS, 2005).

L'uPAR et le LDLR

Lorsque PAI-1 interagit avec le complexe uPA-uPAR, il perd son affinité pour la vitronectine mais l'augmente vis-à-vis d'autres récepteurs transmembranaires appartenant à la famille des LDLR («*low density lipoprotein receptor*»), les LRP («*low density lipoprotein receptor-related protein*») et les VLDLR («*very low density lipoprotein receptor*») (Stefansson *et al*, 1998). Ces récepteurs sont impliqués dans la clairance du complexe PAI-1/uPA-uPAR en induisant son endocytose. Alors que l'uPA et PAI-1 sont dégradés dans les lysosomes, l'uPAR et les intégrines sont recyclés au niveau de la membrane plasmique et impliqués dans un nouveau processus d'adhésion cellulaire (Figure 26C).

(b) PAI-2

PAI-2 est une protéine présente en grande partie sous une forme intracellulaire non glycosylée de 47 kDa, mais un faible pourcentage peut être sécrété sous forme d'une protéine glycosylée de 60 kDa (Myohanen & Vaheri, 2004). La première activité de cet inhibiteur de protéase a été décrite au niveau du placenta (Kawano *et al*, 1970). Son expression est limitée à quelques types cellulaires, tels que les monocytes activés, les kératinocytes (Arman *et al*, 1998) et les cellules trophoblastiques (Feinberg *et al*, 1989). Généralement, PAI-2 est indétectable dans le plasma. Cependant, la concentration en PAI-1 et -2 augmente considérablement durant la grossesse suggérant un rôle dans le maintien de l'hémostase (Gilabert-Estelles *et al*, 2005).

(c) PAI-3 (ou inhibiteur de la protéine C «PCI»)

Le PAI-3, ou l'inhibiteur de la protéine C (PCI) est une protéine synthétisée par le foie mais également présente au niveau du plasma, des urines et des fluides séminaux et folliculaires, suggérant un rôle de cet inhibiteur de protéases dans la reproduction (España *et al*, 1993).

3.2.2.2 L'alpha2-antiplasmine

L' α 2-antiplasmine fait partie de la superfamille des serpins et est le principal inhibiteur direct de la plasmine au niveau du plasma. Il s'agit d'une glycoprotéine simple chaîne de 67 kDa (464 acides aminés) (Holmes *et al*, 1987) qui peut se présenter sous deux formes: 1) une première forme native de 464 acides aminés présentant le domaine N-terminal avec la méthionine ; 2) une deuxième forme plus courte de 12 acides aminés avec une séquence N-terminale débutant par une asparagine (Bangert *et al*, 1993; Lijnen,

2001). L' α 2-antiplasminine forme un complexe avec la plasmine en se liant à un de ses domaines «kringle» en position N-terminale (Myohanen & Vaheri, 2004).

3.2.2 Contribution du système plasminogène/plasmine dans la reproduction

Le rôle joué par le système plasminogène/plasmine au niveau de la reproduction a été élucidé par l'étude de souris déficientes pour l'un ou l'autre de ces composants. Les travaux menés par les équipes de Carmeliet et de Bugges sur les souris Knock out montrent que le système plasminogène/plasmine jouerait un rôle important mais non primordial sur la fertilité (Tableau 6).

Composants du système Plasminogène/plasmine	Délétion	Effets sur la reproduction	Références
PAI-1	+	fertilité normale	(Carmeliet <i>et al</i> , 1993)
uPA	+	pas d'effet sur la portée et réduction de la taille de la décidue	(Carmeliet <i>et al</i> , 1994)
uPAR	+	Aucun effet	(Bugge <i>et al</i> , 1995)
uPA+tPA+PAI	+	fertilité réduite et dépôt de fibrine dans le stroma utérin	(Carmeliet <i>et al</i> , 1995)

Tableau 6 : Effets de la délétion d'un gène du système plasminogène/plasmine sur la reproduction.

3.2.3.1 Expression et rôle des composants du système plasminogène/plasmine au niveau de l'endomètre

Les premières études menées sur le système fibrinolytique ont été réalisées sur les fluides utérins. Ces travaux ont montré que l'activité lytique, essentiellement due à une expression importante de l'uPA, est augmentée durant la phase proliférative, atteint un maximum au milieu du cycle (période d'ovulation), pour décliner durant la phase sécrétoire et ré-augmenter pendant les menstruations (Casslen & Astedt, 1981). Un des rôles possibles de l'uPA au niveau du fluide utérin durant la période d'ovulation serait la stimulation des spermatozoïdes. En effet, la mobilité des spermatozoïdes est dépendante de la concentration en uPA (Nordengren *et al*, 2004). De même, des explants d'endomètre pris au milieu du cycle contiennent l'uPA de façon plus abondante que les biopsies obtenues en phase proliférative ou sécrétoire (Casslen & Astedt, 1983). Ces biopsies sécrètent plus d'uPA que de tPA, suggérant qu'au niveau de l'endomètre, l'activité plasminolytique est essentiellement liée à l'uPA (Casslen & Astedt, 1983).

Le système plasminogène/plasmine semble être influencé par les variations des taux stéroïdiens au cours du cycle menstruel. En effet, l'expression d'uPA, uPAR et de PAI-1 est diminuée en phase sécrétoire sous l'effet de la progestérone et augmente en période périmenstruelle (Nordengren *et al*, 2004). La culture de cellules endométriales en présence de progestérone induit la dégradation de l'uPA en augmentant l'expression de PAI-1 et d'uPAR (Casslen *et al*, 1995; Norwitz *et al*, 2007). De même, l'induction de la décidualisation de cellules endométriales induit la diminution de l'activité de protéases à sérine (uPA et tPA) et augmente l'expression de leur inhibiteur PAI-1 (Schatz *et al*, 1995). En effet, la formation du complexe PAI-1/uPA/uPAR induit son internalisation et la dégradation de l'uPA et du PAI-1 par les lysosomes.

Des analyses réalisées par hybridation *in situ*, comparant l'expression de l'uPA, de PAI-1 et d'uPAR au niveau de l'endomètre eutopique, par rapport au tissu endométriotique, montrent une expression différente en fonction du type cellulaire. En effet, l'expression d'uPA et de PAI-1 semble être essentiellement stromale, tandis qu'uPAR est exprimé par les cellules glandulaires et stromales (Bruse *et al*, 2004). Ces données sont confirmées en immunohistochimie par les résultats de Nordengren *et al* (Nordengren *et al*, 2004). Le profil d'expression de PAI-1, d'uPA et uPAR rappelle en partie l'expression des MMPs dont l'expression est également diminuée sous l'effet de la progestérone. Ainsi, durant la phase sécrétoire, on observe, d'une part, une augmentation de la synthèse des différents composants de la matrice extracellulaire (collagène, fibrine et laminine) (Farrar & Carson, 1992; Zhu *et al*, 1992) et, d'autre part, une diminution de leur dégradation par les systèmes protéolytiques. Ceci a pour conséquence de consolider la matrice endométriale.

L'augmentation de l'expression des protéases à sérine (uPA et/ou PAI-1) est également associée à certaines pathologies de l'endomètre, telles que l'endométriose et carcinomes (Nordengren *et al*, 1998; Bruse *et al*, 1998; Bruse *et al*, 2004; Gilabert-Estelles *et al*, 2005).

3.2.3.2 Expression et rôles des composants du système plasminogène/plasmine lors de la placentation

L'implantation, l'invasion trophoblastique, le remodelage vasculaire et le maintien d'un flux sanguin dans les villosités dépendent fortement de la production d'enzymes protéolytiques, tels que les activateurs du plasminogène.

Les études en immunohistochimie et en hybridation *in situ* montrent que les différents composants du système plasminogène/plasmine (uPA, tPA, PAI-1, PAI-2 et uPAR) sont exprimés au niveau du placenta humain (Hu *et al*, 1999). Cependant, l'expression d'un facteur peut être spécifique d'un type cellulaire. En effet, PAI-1 est plus exprimé par les

cytotrophoblastes villos, hautement invasifs, que par le syncytiotrophoblaste (Feinberg *et al*, 1989; Hofmann *et al*, 1994; Floridon *et al*, 2000; Astedt *et al*, 1986), tandis que uPAR est fortement exprimé par les cellules déciduales (Nishida *et al*, 1998). L'expression de PAI-1 jouerait un rôle dans l'invasion de cellules trophoblastiques et dans les remodelages de la matrice extracellulaire.

L'augmentation de l'expression de PAI-1 est liée à certaines pathologies de la grossesse, telles que la pré-éclampsie, caractérisée par un déficit d'invasion trophoblastique provoquant des anomalies de la vascularisation et un état d'hypoxie placentaire (Estelles *et al*, 1994; Estelles *et al*, 1998; Redman & Sargent, 2005). Il a été démontré par plusieurs équipes que dans les conditions hypoxiques, l'expression de HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor) induit l'augmentation de PAI-1 par les cellules trophoblastiques (Koklanaris *et al*, 2006; Meade *et al*, 2007). Cette modulation est assurée via un élément de réponse HRE (Hypoxic Response Element) présent au niveau du promoteur du gène PAI-1 et répondant à HIF-1 (Kietzmann *et al*, 1999). Au niveau du placenta, l'expression de PAI-1 peut être régulée par plusieurs facteurs de croissance et cytokines tel que le HIF-1 et le TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α). En effet, l'expression de PAI-1 est également augmentée par le TNF- α . En conséquence aux taux élevés de PAI-1, la migration des cellules trophoblastiques est inhibée (Bauer *et al*, 2004; Huber *et al*, 2006). PAI-1 peut bloquer cette migration via plusieurs mécanismes. Il peut (1) directement inhiber l'action de l'uPA et inhiber ainsi la dégradation de la matrice extracellulaire ou (2) inhiber la migration des trophoblastes en inhibant la liaison de la vitronectine à l'intégrine α V β 3 ou la liaison de la vitronectine à l'uPAR. En effet, l'intégrine α V β 3 et l'uPAR contribuent à l'invasion et la migration des cellules trophoblastiques (Zhou *et al*, 1997; Liu *et al*, 2003).

L'équipe de Teesalu et ses collaborateurs s'est intéressée à l'analyse de l'expression des facteurs du système plasminogène/plasmine au niveau des sites d'implantation de souris entre les jours 5.5 et 9.5 *post coïtum*. Leurs résultats démontrent qu'en fonction de l'évolution de la gestation, différents types cellulaires expriment soit l'uPA, le PAI-1 ou l'uPAR (Teesalu *et al*, 1996).

La même équipe a montré qu'entre les jours 10.5 et 11.5 *post-coïtum*, le transcrit de PAI-1 est présent au niveau du placenta murin, essentiellement au niveau des cellules géantes, du spongiotrophoblaste, de même que les trophoblastes tapissant les vaisseaux sanguins maternels au niveau du labyrinthe (Teesalu *et al*, 1998). A 18.5 jours de gestation, l'expression de PAI-1 est nettement diminuée et est limitée à une sous population du spongiotrophoblastes (Teesalu *et al*, 1998). L'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) est exprimé par les cellules déciduales à la mi-gestation (entre

les jours 10.5 et 12.5 *post coïtum*). Quant au récepteur du l'uPAR, il est détecté entre les jours 10.5 et 11.5 *post coïtum* au niveau des cellules géantes et du spongiotrophoblaste (Teesalu *et al*, 1998).

Une analyse plus ciblée au niveau de la décidue a montré que l'ARNm messenger codant pour l'uPA est exprimé par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins convergeant pour former le canal sanguin central qui va alimenter le labyrinthe à 9.5 jours *post coïtum*. Cependant, l'expression de PAI-1 est confinée aux cellules déciduales entourant ces vaisseaux sanguins (Bacharach *et al*, 1992). Ceci suggère que l'interaction directe entre PAI-1 et uPA, exprimés par les deux types cellulaires, joue un rôle important dans la régulation de l'angiogenèse au niveau de la décidue.

L'expression de PAI-1 par les cellules trophoblastiques confirme le rôle joué par ce facteur dans la migration et l'invasion cellulaires. En effet, l'invasion des cellules trophoblastiques est accomplie par des répétitions de cycles d'adhésion et de détachement. Ces cycles facilitent la mobilité cellulaire via sa liaison à la vitronectine qui est associée à une dégradation protéolytique des composants de la matrice extracellulaire contrôlée par sa liaison à l'uPA.

III- Buts et plan du travail

Des données antérieures de notre laboratoire ont montré le rôle essentiel de PAI-1 dans l'angiogenèse tumorale et choroïdienne (Bajou *et al*, 1998; Bajou *et al*, 2001; Lambert *et al*, 2001; Maillard *et al*, 2005). De même, une surexpression de PAI-1 a été mise en évidence dans diverses pathologies de la reproduction, telles que la pré-éclampsie et l'endométriose (Estelles *et al*, 1994; Estelles *et al*, 1998; Gilabert-Estelles *et al*, 2005; Gilabert-Estelles *et al*, 2007; Zorio *et al*, 2008). Cependant, le rôle exact de PAI-1 ainsi que ses mécanismes d'action dans ces pathologies n'ont jamais été déterminés.

Afin de comprendre et d'élucider le rôle probable joué par PAI-1 au cours de la placentation, nous avons réalisé des analyses morphologiques et morphométriques des sites d'implantation murins déficients pour PAI-1.

Cette partie des résultats sera présentée dans la publication N°1 :

Publication N°1: Mouse PAI-1 promotes placentation by increasing foetal and maternal angiogenesis (Soumis pour publication).

La deuxième partie de nos travaux s'est orientée sur l'étude des métrorragies dysfonctionnelles associées à l'utilisation de dispositif intra-utérin à libération hormonale dans le cadre d'une contraception. Les saignements associés à ce dispositif constituent l'inconvénient majeur pour les utilisatrices. Nous avons émis l'hypothèse que l'origine de ces saignements pourrait être due à une fragilisation de la matrice extracellulaire et du réseau vasculaire.

Nous avons dès lors focalisé cette partie de notre travail, d'une part, sur l'analyse du réseau vasculaire endométrial, et d'autre part, sur l'analyse de l'expression des métalloprotéases, enzymes largement documentées pour leur rôle dans le remodelage de la matrice extracellulaire.

Cette partie des résultats sera présentée sous forme d'un résumé des publications issues de notre travail :

Publication N°2: *Endometrial vessel maturation in women exposed to Levonorgestrel-releasing intrauterine system for short or prolonged period of time. Human Reproduction, 2007; 22(12): 3084-3091*

Publication N°3: *Differential elevation of matrix metalloproteinase expression in women exposed to Levonorgestrel-releasing intrauterine system for short or prolonged period of time. Human reproduction, 2008 (sous presse).*

IV-Résultats

Chapitre 1. La placentation chez les souris déficientes pour PAI-1

L'invasion trophoblastique est souvent comparée à une invasion tumorale. Cette comparaison est basée sur certaines similitudes, dont la production d'enzymes matricielles (MMPs, protéases à sérine,...), la dégradation de la matrice extracellulaire et l'invasion des tissus environnants. Plusieurs résultats du laboratoire ont déjà montré le rôle majeur joué par PAI-1 au cours de l'invasion tumorale et de la néoangiogenèse. En effet, les souris déficientes pour PAI-1 présentent un retard de croissance tumorale et d'angiogenèse par rapport à leurs correspondantes sauvages (Bajou *et al*, 2001; Devy *et al*, 2002; Maillard *et al*, 2005). Cependant, son rôle au cours de la placentation n'a pas encore été élucidé. Ainsi, nous nous sommes intéressés dans ce chapitre à l'étude du rôle potentiel de PAI-1 au cours du développement placentaire chez la souris.

Résumé des résultats

Nos premières analyses ont été réalisées à 10.5 jours de gestation (ou *post-coïtum*), c'est-à-dire, au moment où l'entièreté du placenta est formée chez la souris. A l'issue des résultats obtenus lors de cette première analyse, des observations complémentaires ont été effectuées à 12.5 et 14.5 jours de gestation.

1.1 Des anomalies vasculaires et une réduction de la taille du labyrinthe sont observées à 10.5 jours de gestation

La comparaison histologique confirmée par une coloration May-Grünwald-Giemsa et une immunohistochimie anti-kératine du placenta des souris PAI-1^{-/-} par rapport à celui des souris PAI-1^{+/+}, a révélé des différences majeures au niveau du labyrinthe. En effet, chez les souris PAI-1^{-/-} cette structure présente un nombre important de trophoblastes

formant un réseau cellulaire dense et peu infiltré par des vaisseaux sanguins fœtaux et maternels, par rapport à ce qui est observé chez les souris PAI-1^{+/+}.

Afin de confirmer nos observations morphologiques, une méthode de quantification a été mise au point. Cette méthode d'analyse a clairement démontré une diminution statistiquement significative de la densité vasculaire fœtale et maternelle, de même qu'une augmentation de la densité trophoblastique chez les souris PAI-1^{-/-} par rapport aux souris PAI-1^{+/+}.

Parallèlement à ces anomalies, la déficience en PAI-1 induit des anomalies de taille au niveau des différentes structures placentaires. En effet, nous avons observé chez les souris PAI-1^{-/-} une décidue plus épaisse et un labyrinthe de taille réduite en comparaison au placenta des souris PAI-1^{+/+}. Cette différence de taille au niveau du labyrinthe et de la décidue a été confirmée par la comparaison du rapport de l'épaisseur de la décidue à l'épaisseur du labyrinthe. Ce rapport est significativement augmenté chez les souris PAI-1^{-/-}, suite à la réduction de l'épaisseur du labyrinthe et à l'augmentation de la taille de la décidue.

1.2. Rétablissement de l'architecture mais pas de la taille au niveau du labyrinthe après 12.5 jours de gestation

L'analyse des sites d'implantation après 12.5 jours de gestation a montré un rétablissement de l'architecture du labyrinthe chez les souris déficientes pour le gène PAI-1. En effet, la densité et la disposition des cellules trophoblastiques sont comparables à celles observées chez les souris sauvages. En conséquence, la quantification de la densité des réseaux vasculaires fœtaux et maternels ainsi que celle des cellules trophoblastiques n'ont montré aucune différence entre les deux groupes de souris. Cependant, la taille du labyrinthe reste significativement réduite chez les souris PAI-1^{-/-}. Nous avons également observé une différence au niveau du spongiotrophoblaste qui représente la zone de jonction entre la décidue et le labyrinthe. Chez les souris déficientes pour PAI-1, cette partie du placenta apparaît plus dense en cellules trophoblastiques, moins lacunaire et plus large en comparaison au spongiotrophoblaste des souris sauvages. Le calcul des rapports décidue/labyrinthe et spongiotrophoblaste/labyrinthe confirme les données histologiques.

1.3 Après 14.5 jours de gestation, le placenta des souris PAI-1^{-/-} est comparable à celui des souris sauvages

Les différences observées après 10.5 et 12.5 jours de gestation nous ont conduits à l'analyse des sites d'implantation après 14.5 jours de gestation. Aucune différence morphologique n'a été observée au niveau de la décidue, du spongiotrophoblaste ou du labyrinthe des souris déficientes pour PAI-1.

Conclusions

Les données développées dans ce chapitre démontrent l'implication de PAI-1 dans l'invasion trophoblastique ainsi que l'établissement d'un réseau vasculaire correct au niveau du labyrinthe qui représente la surface d'échanges fœto-maternels au niveau du placenta murin. Cependant, l'impact de PAI-1 sur cette invasion cellulaire dépend de la période de gestation. En effet, nous avons montré par des analyses morphologiques et morphométriques, que la déficience en PAI-1, à 10.5 jours de gestation, est associée à une diminution des réseaux vasculaires fœtaux et maternels, parallèlement à une augmentation de la densité trophoblastique. Nous avons également observé une diminution de la taille du labyrinthe et une augmentation de l'épaisseur de la décidue.

Le rôle, largement documenté, de PAI-1 sur la migration et l'invasion cellulaires via sa liaison à d'autres ligands que l'uPA et le tPA, telle que la vitronectine, nous mène à proposer l'hypothèse selon laquelle, chez les souris PAI-1^{-/-}, les cellules trophoblastiques du labyrinthe prolifèrent *in situ* sans acquérir un phénotype migratoire important. Cette prolifération cellulaire en l'absence de migration engendrerait à son tour la formation d'un réseau cellulaire dense qui affecterait la mise en place du réseau vasculaire fœtal et maternel.

Mouse PAI-1 promotes placentation by increasing foetal and maternal angiogenesis.

Soraya Labied¹, Silvia Blacher¹, Carine Munaut¹, Sophie LeMaire⁴, Agnès Noël¹, Peter Carmeliet², Jean-Michel Foidart^{1,3} & Francis Frankenne¹

¹Laboratory of Tumour and Development Biology, Université de Liège, Tour de Pathologie (B23), Center of Experimental Cancer Research (CECR), Center for Biomedical Integrative Genoproteomics (CBIG), B-4000 Liège, Belgium.

²Center of Transgene technology and Gene Therapy, Katholieke Universiteit Leuven, B-3000 Leuven.,

³Department of Gynecology, CHU, University of Liège, B-4000 Liège, Belgium.

⁴Department of Electricity, Electronics and Computer Science Signal Processing group. University of Liège. Grande Traverse (B28), B-4000, Liège, Belgium.

Editorial correspondence: Francis Frankenne Laboratory of Tumour and Development Biology, Université de Liège, Tour de Pathologie (B23), Sart-Tilman; B-4000 Liège. Tel: 32-4-366.25.30, Fax: 32-4-366.29.36, E-mail: Francis.Frankenne@ulg.ac.be

ABSTRACT

Murine placentation is associated with trophoblast cell invasion of maternal endometrium and extensive maternal and foetal angiogenesis. Both processes involve proteases-dependent extracellular matrix remodelling. Among the protease inhibitors, plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) is transiently produced by spongiotrophoblasts and trophoblast giant cells at 10.5-11.5 day post-coitum (dpc). PAI-1 is an angiogenic molecule that promotes tumoural and choroidal neovascularisation. We have therefore analyzed the consequence of PAI-1 deficiency on murine placentation and pregnancy outcome. We measured by quantitative computer-assisted image analysis, the relative thickness of labyrinth, decidua and spongiotrophoblast at days 10.5, 12.5 and 14.5 dpc in PAI-1 deficient (PAI-1^{-/-}) and wild type mice. At 10.5 and 12.5 dpc, an abnormal placental morphology was observed in both labyrinth and spongiotrophoblast layers in PAI-1^{-/-} mice. Lack of PAI-1 resulted in transient decreased maternal and foetal vascularisations of the placenta that caused (1) an enhancement in decidua/labyrinth and labyrinth/spongiotrophoblast thickness ratios, (2) a significant increase of trophoblast density. Normalization of placental morphology occurred by day 14.5 dpc in PAI-1 deficient mice. In conclusion, despite a transient PAI-1 requirement for optimal placental angiogenesis, this gene does not appear to be essential for trophoblast invasion and placentation.

Keys Words: Placentation, trophoblast, proteases and PAI-1

INTRODUCTION

Extensive maternal and foetal vascular remodelling during placentation results in a large network of closely apposed but separated maternal and foetal circulations [1]. The maternal vascular bed of uterus changes dramatically during pregnancy as existing vessels dilate and new vessels form [2]. In addition, in primates and rodents, terminal vascular bed is not lined by endothelial cells but is rather hemochorial, meaning that maternal blood perfuses a space lined by trophoblast cells. Failure in placental angiogenesis leads to

pregnancy disorders, including miscarriages, foetal growth restriction and preeclampsia [3].

The precise molecular mechanisms that regulate maternal vascular development during gestation and its relationship to foetoplacental development are largely unknown. Adequate placentation involves successful invasion of uterine decidua by primary and secondary trophoblast giant cells. These cells express several factors with potent angiogenic (e.g., VEGF, Proliferin) and vasoactive (e.g., nitric oxide, Adrenomedullin) effects [4]. Their

invasive property is associated with their capacity to secrete serine proteases (plasminogen/plasmin) and matrix metalloproteinases (MMPs) that degrade the extracellular matrix [5]. A functional synergism of both protease families regulates vascularisation during placental development [6]. The plasminogen/plasmin system consists of an inactive proenzyme, plasminogen which is converted into plasmin by urokinase-type plasminogen activator (uPA) or tissue-type plasminogen activator (tPA). Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) is a primary regulator of (uPA) [7;8]. It inhibits uPA by forming a covalent complex, thus blocking uPA's interaction with substrates.

By binding with vitronectin, PAI-1 can be stabilized and retain its activity. PAI-1 expression is regulated by many intrinsic factors (e.g. cytokines, growth factors, hormones, and lipids) and extrinsic factors (e.g. physical injury and DNA-damaging agents). PAI-1 is an essential regulator in physiological thrombotic/fibrinolytic process in vessels. It also binds in the extracellular matrix (ECM) where it controls local proteolysis by inhibiting uPA. PAI-1 can regulate cell adhesion through either inhibition of uPA or interference with the binding between cellular integrins or uPA receptor (uPAR) and vitronectin. By this mechanism, PAI-1 regulates cell migration [9]. During implantation, PAI-1 is produced only by spongiotrophoblast and trophoblast giant cells at days 10.5-11.5 dpc [10]. The cell specific and timely regulated expression of PAI-1 in placenta suggests that it might play a significant role, during early phases of placental vascular remodelling.

Many features of trophoblast invasion are similar to tumour cell invasion. In cancer, PAI-1 plays a major role in regulating tumour invasion and neoangiogenesis. *In vivo* experiments revealed: (1) high levels (pharmacological level) of PAI-1 prevent angiogenesis and tumourigenesis; (2) low levels (physiological level) of PAI-1 conversely facilitate tumour growth and angiogenesis, and (3) in the absence of PAI-1 in mice, tumour growth and angiogenesis could not progress [11-13]. We have shown in a variety of *in vivo* and *in vitro* models of angiogenesis that the

angiogenic property of PAI-1 results from its ability to inhibit plasmin and thereby to protect invasive angiogenic vascular endothelial cells from proteolytic degradation [14-19].

Although accumulating evidence demonstrates the key role of PAI-1 in pathological angiogenesis, its function during placental vascularisation remains to be elucidated. PAI-1 knockout mice are fertile and the litter sizes are normal [20]. These data are puzzling, since PAI-1 is normally expressed in the implantation site and is known to be a major player in many tissue remodelling processes.

In the present study, we have therefore studied the possible role of PAI-1 during mouse placentation by quantifying placental vessel density at 10.5, 12.5 and 14.5 dpc in mice deficient for PAI-1 or in control mice. An original method of computer-assisted image analysis allowed us to quantify alterations of several placental compartments identified with specific antibodies. The placenta of PAI-1^{-/-} mice showed at days 10.5-12.5 an abnormal delayed maternal and foetal vascularisation, indicating that PAI-1 is transiently required for adequate foetal and maternal placental angiogenesis. This phenotype resumed with disappearance of placental PAI-1 expression from day 14.5 indicating that angiogenic molecules, other than PAI-1 play an important role in placental vascularisation.

MATERIALS AND METHODS

Transgenic mice

Homozygous mice with a single gene deficiency (PAI-1^{-/-}) and the corresponding wild type (WT) animals (PAI-1^{+/+}) were previously described [21]. To generate homozygous embryos in mothers of the same genotype, homozygote knockout and WT females were mated with homozygotes knockout and WT males, respectively, with proven fertility and checked for pregnancy by occurrence of vaginal plugs in the morning. The day of vaginal copulation plug detection was designated as day 0.5 post-coitum (dpc). Embryos were collected at 10.5, 12.5 and 14.5 dpc. At each time point, 6 to 9 embryos were obtained from three different females.

Tissue preparation

Pregnant females at 10.5, 12.5 and 14.5 dpc were killed by cervical dislocation. The two uterine horns were removed to isolate and separate the different fetoplacental units. Length and width of each of them were measured just after dissection. The fetoplacental units of first horn were fixed in 10% formol for 1 hour, at room temperature. Dehydration was achieved by incubating embryos, 2 times for 1 hour in increasing concentrations of alcohol (70% to 95% ethanol) followed by isopropanol and xylol. Specimens were then embedded in Paraplast Plus (Labonord, Rekkem, Belgium). The fetoplacental units of second horn were embedded in Tissu-Teck (Labonord), snap frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until use.

Histological analysis

Serial sections (5 µm thick) were stained with Hematoxylin and Eosine (H&E) or May-Grünwald-Giemsa (MGG) staining (Merck, Darmstadt, Germany) for classical morphology analysis. To identify trophoblast cells in labyrinth and spongiotrophoblast, frozen sections were dried for 10 min, fixed with paraformaldehyde (PFA) 4% for 10 min, permeabilised in Triton X-100 1% for 5 min, incubated with 1,5% milk and 0,5% Tween-20 for 30 min at room temperature and then incubated with primary antibody (Ab). Incubation with anti-keratin Ab (rabbit anti-mouse, Z0622, DAKO, Denmark) diluted 1/200 was performed at 25°C during 2h [22]. Sections were washed in PBS (5x 5min) before incubation with the appropriate secondary Ab (swine anti-rabbit, DAKO) conjugated to tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC) diluted 1/40, for 30 min, at room temperature.

Decidual cells were labeled by specific staining for desmin [23;24] as follows: paraffin sections were heated in microwave oven set at 1.4 bar and 126°C for 11 min in 10 mM citrate buffer, pH 6. Incubation with monoclonal mouse anti-desmin Ab (M0760, DAKO) (diluted 1/100) was conducted for 30 min at room temperature and detected with ARK system (K3954, DAKO,

Danmark) [25;26]. The DAB system was used for final staining.

Panendothelial cell “MECA32” Ab (75861E, Pharmingen, San Jose, CA, USA) was used to identify both maternal and foetal blood vessels [27]. For this purpose, sections were fixed in acetone at -20°C for 10 min then in 80% methanol for 10 min at 4°C. The primary Ab (rat-anti mouse MECA32) diluted 1/10, was incubated overnight at 4°C followed by the appropriate secondary Ab for 30 min at room temperature then revealed with DAB system.

For fibrin/fibrinogen staining, cryostat sections were dried for 10 min, and then fixed in acetone at -20°C for 10 min. The primary Ab (polyclonal goat anti-mouse fibrinogen) was incubated for 2 hours at room temperature diluted 1/400 and then incubated with the secondary Ab (rabbit-anti-goat/HRP).

May-Grünwald-Giemsa (MGG) staining

Paraffin sections were incubated 20 min at 37°C with the May-Grünwald (Merck) solution. For use the May Grünwald stock solution was diluted 1/8 with Sorensen buffer (pH 6.4). After rinsing in Sorensen buffer, sections were stained 40 min with Giemsa solution (Merck) at 37°C (stock solution was diluted 1/75 with Sorensen buffer) and then incubated 4 min in 0,1% acetic acid [28].

Quantification of trophoblast, foetal and maternal blood vessel density

Image processing, using Aphilion3.2 (Adsis, Meythet, France) software, was performed according to following steps: Images were registered in the RGB color space, in which maternal erythrocytes appeared red whereas foetal red cells were colored as mauve dots and trophoblast cells as purple-blue regions (Fig. 1a). Area was delineated by drawing a manual limiting zone (Fig. 1b). Two windows were drawn manually in order to discriminate between maternal (Fig. 1c) and foetal vessels (Fig. 1d). The region corresponding to trophoblast cells (Fig. 1e) was then obtained by subtracting the images c and d from the image b. Resulting images were binarized (Figs. 1f, g, h) and maternal and foetal vessel and trophoblast cell

densities were determined as the quotient between the surface occupied by maternal vessels, foetal vessels and trophoblast cells and the surface of the region of interest (Fig. 1b).

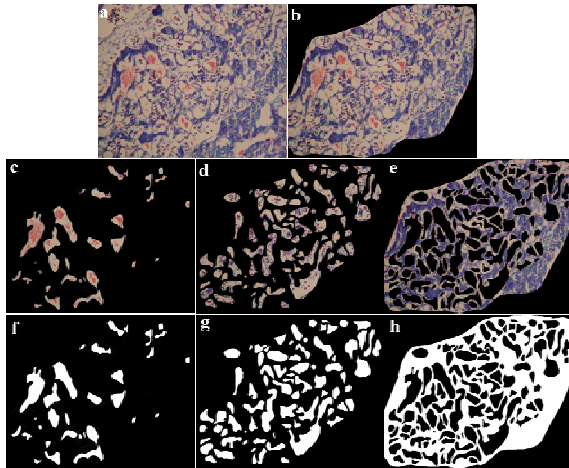


Fig 1: Quantification method of maternal vessels, foetal vessels and trophoblast cells by computer-assisted image analysis. (a) Histological cross-section of labyrinth, (b) Window with isolated labyrinth layer, (c) Window allowing to isolate maternal vessel, (d) foetal vessels and (e) trophoblast cells. (f) Binary images of maternal vessel, (g) foetal vessels and (h) trophoblast cells.

Morphometric analysis of labyrinth and decidua thickness

Different zones, which in the murine placenta include the labyrinth, the spongiotrophoblast, trophoblast giant cells and maternal decidua, were identified in H&E sections.

Width of labyrinth, spongiotrophoblast and decidua were determined by drawing a line parallel to the base of the labyrinth, identifying the midpoint of this line, and then extending a perpendicular line first to the outer edge of the spongiotrophoblast (junctional zone) and then up to the peripheral edge of the decidua (Fig. 2 g)

Evaluation of labyrinth, spongiotrophoblast and decidua thickness was determined by calculating decidua/labyrinth and spongiotrophoblast/labyrinth ratios.

Microscopic images of fetoplacental sections stained with hematoxylin-eosine were acquired via a numerical camera (Nikon, Coolpix 990, Tokyo, Japan) with identical magnification. For each sample, whole implantation site with the embryo *in situ* was cut and morphometric

measurement was performed on 5 sections chosen in the extremities and the middle part of the placenta using the *IMAGE J* software. The average of these five values was determined for each implantation site.

Statistical analysis

Data were analyzed by using GraphPad 4.0 software (San Diego, CA). A Mann-Whitney test was used to determine if difference between experimental groups could be considered as significant.

RESULTS

At 10.5 dpc, maternal and foetal vascularisation are abnormal in PAI-1^{-/-} mice

Histological examination of PAI-1^{+/+} and PAI-1^{-/-} implantation sites was performed at 10.5 dpc when embryonic and maternal placental vessels invade the labyrinth. Placental circulation was assessed by the presence of vessels containing nucleated foetal erythrocytes stained in mauve by MGG (Fig. 2a). Maternal vessels, which are remodeled and where endothelial cells are substituted by trophoblast cells, were characterized by their content in red enucleated erythrocytes (Fig. 2a). Maternal and embryonic circulations were in close proximity in the labyrinth layer (Fig. 2A) which was composed of thin strands of trophoblast cells positive for keratin (Fig. 2c) intermingled with extensive networks of foetal and maternal vessels. In PAI-1^{-/-} mice, the labyrinth was characterized by a dense network of thicker strands of keratin positive trophoblastic cells (Fig. 2b, d) which were poorly infiltrated by maternal and embryonic vessels.

Both foetal and maternal blood vessel densities were reduced in PAI-1 deficient mice in comparison to WT mice ($p < 0.02$) (Figs. 3a, b). In addition, a 35% increased trophoblast cell density was noted in PAI-1^{-/-} mice ($p = 0.0047$) (Fig. 3c).

Immunostaining of foetal and maternal blood vessels by using an anti-MECA-32 Ab confirmed the reduction of blood vessel number and confirmed the reduced development of the labyrinth in PAI-1^{-/-} mice (Fig. 2e, f). No difference was seen in spongiotrophoblast layer between these two groups of mice.

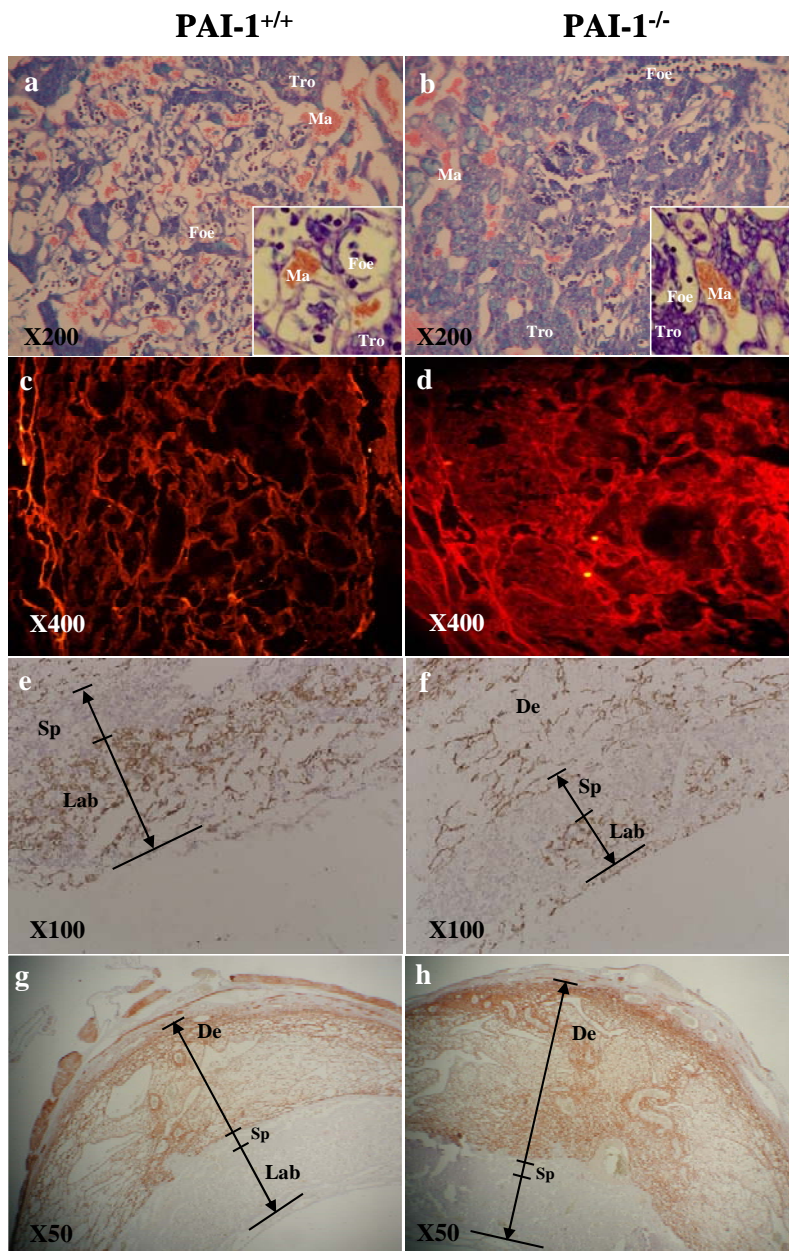


Fig 2:Labyrinth and decidua histology in implantation sites of wild type and PAI-1 deficient mice at **10.5 dpc**.

Embryos were collected at 10.5 dpc in PAI-1^{+/+} (left panels) and PAI-1^{-/-} (right panels).

a-b: May-Grünwald-Giemsa coloration of labyrinth layer (magnification x200). **c-d:** Trophoblast cells staining using anti-keratin Ab (magnification x400). **Foe:** Foetal blood vessels; **Ma:** Maternal blood vessels; **Tro:** Trophoblast cells. **e-f:** Labeling of foetal blood vessels using MECA-32 Ab in the labyrinth layer (magnification x100). **G-h:** Labeling of the decidua using anti-desmin Ab (magnification x50). **De:** Decidua; **Lab:** Labyrinth; **Sp:** Spongiotrophoblast.

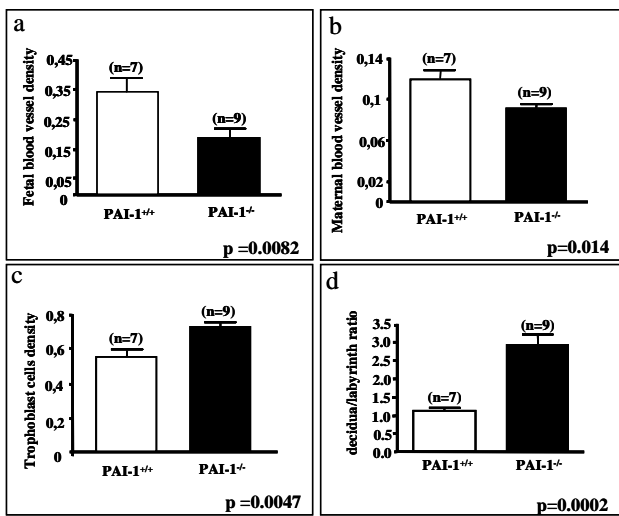


Fig 3: a, b and c: Quantification of foetal and maternal blood vessels and trophoblast cells density at 10.5 dpc. Quantification was performed according to the computer-assisted method described in materials and methods and in Fig 1. **A:** foetal blood vessel density. **B:** maternal blood vessel density. **C:** trophoblast cells density. **d:** Calculation of the decidua/labyrinth ratio at 10.5 dpc in PAI-1^{+/+} and PAI-1^{-/-} mice. Decidua and labyrinth thickness were measured on microscopic images of hematoxylin-eosine stained sections of fetoplacental unity as described in materials and methods. Five different measurements were performed for each sample and results represent the average of all values. The number of implantation sites analyzed is indicated (n).

At 10.5 dpc, the relative decidua/labyrinth thickness is increased in PAI-1^{-/-} mice

The decidua, as specifically identified with an anti-desmin antibody, appeared larger in PAI-1^{-/-} mice than in WT animals (Figs. 2g, h). A quantitative morphometric assessment of relative labyrinth and decidua thickness, carried out with *IMAGE J* software confirmed the relative poorer development of labyrinth and the higher extension of decidual layer in PAI-1^{-/-} mice in comparison to WT mice. The decidua/labyrinth ratio was 2.3 fold higher in PAI-1^{-/-} than in their WT counterpart (Fig. 3d). This increased ratio was related to a thicker decidua and a thinner labyrinth layer in PAI-1^{-/-} mice (p=0.0002). This is presumably the consequence of a decreased decidual invasion by trophoblast cells.

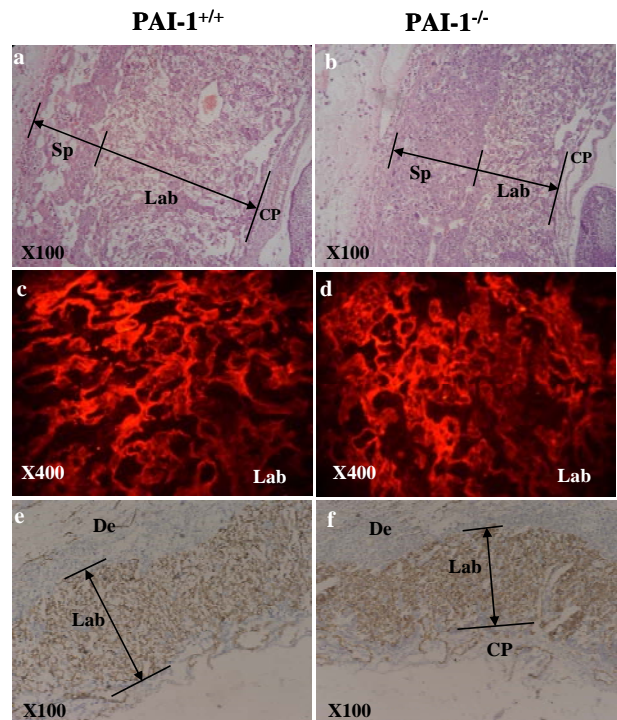


Fig 4: Labyrinth, spongiotrophoblast and decidua histology and blood vessel architecture in implantation sites of PAI-1^{+/+} and PAI-1^{-/-} at 12.5 dpc.

Embryos were collected at 12.5 dpc in PAI-1^{+/+} (left panels) and PAI-1^{-/-} (right panels). **a-b:** Overview of the labyrinth layer with hematoxylin&eosin coloration (magnification x100). **c-d:** Fluorescent labeling of trophoblast cells using anti-keratin Abs (magnification x400). **e-f:** Labeling of foetal blood vessels in the labyrinth layer using MECA-32 Abs (magnification x100)

CP: Chorionic plate; **De:** Decidua; **Lab:** Labyrinth; **Sp:** Spongiotrophoblast

At 12.5 dpc, PAI-1^{-/-} mice displayed a smaller labyrinth, a larger spongiotrophoblast layer but a restored labyrinthic vascularisation

At day 12.5, important differences appeared in the spongiotrophoblast (Fig. 4a, b). In PAI-1^{-/-} mice, spongiotrophoblast appeared much denser with more trophoblast cells and less lacunar structures, leading to an increased thickness (Fig. 4b). Morphometric measurement revealed a 34% increased spongiotrophoblast/labyrinth ratio in PAI-1^{-/-} mice (Fig. 5a). The relative decidua/labyrinth ratio was again more important in PAI-1^{-/-} mice (Fig. 5b). Thus, at day 12.5, PAI-1 deficiency led also to a reduction of the

labyrinth thickness and an enhancement of thickness of spongiotrophoblast layer. However, in sharp contrast to the observation performed at 10.5 dpc, the labyrinth morphology (Figs. 4c, d) and vessel density (Figs. 4 e, f) evaluated with an anti-MECA32 antibody appeared identical in WT and PAI-1^{-/-} mice, suggesting a normalization of the labyrinth structure. Quantification of foetal and maternal blood vessel and trophoblast cells densities confirmed these observations (Fig. 5c, d, e).

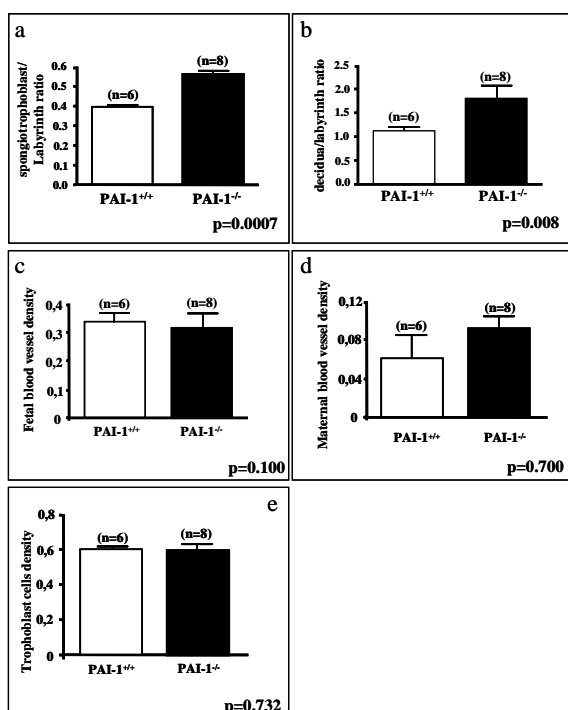


Fig 5: a and b: A: Spongiotrophoblast/labyrinth ratio B: Decidua/labyrinth ratio in PAI-1^{+/+} and PAI-1^{-/-} mice at 12.5 dpc. Five different measurements were performed for each sample and results represent the average of all values. **c, d and e:** Quantification of foetal and maternal blood vessels and trophoblast cells density at 12.5 dpc. Quantification was performed according to the computer-assisted method described in materials and methods and in Fig 1. **a:** foetal blood vessel density. **b:** maternal blood vessel density. **c:** trophoblast cell density. The number of implantation sites analyzed is indicated (n).

Normal labyrinth morphology is restored in PAI-1^{-/-} mice between 12.5 and 14.5 dpc

At day 14.5, the morphological differences in the placenta of PAI-1^{-/-} or WT mice demonstrated at days 10.5 and 12.5 were no longer present. The decidua/labyrinth ratio was identical in WT and

PAI-1^{-/-} mice (Fig. 6a). Morphometric quantifications confirmed the restoration of placental morphology in PAI-1 deficient mice (Figs. 6c, c,d).

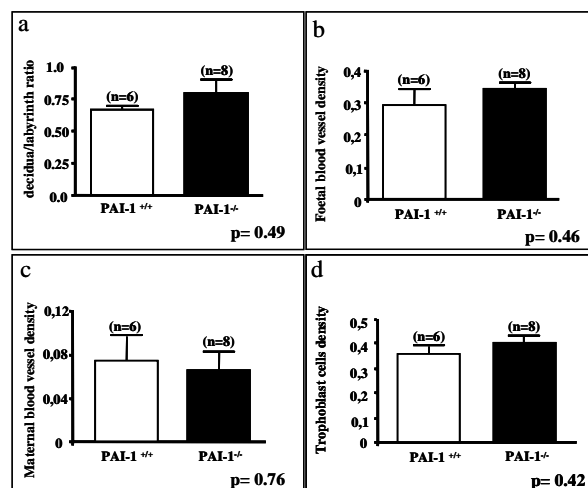


Fig 6: a: Decidua/labyrinth ratio in PAI-1^{+/+} and PAI-1^{-/-} at 14.5 dpc. The difference between the two groups is no significant ($p > 0.4908$). **b, c and d:** Quantification of foetal and maternal blood vessels and trophoblast cells density at 14.5 dpc. Quantification was performed according to the computer-assisted method described in materials and methods and in Fig 1. **A:** foetal blood vessel density. **B:** maternal blood vessel density. **C:** trophoblast cell density. The number of implantation sites analyzed is indicated (n).

DISCUSSION

Trophoblast invasion and tissue remodelling development have been extensively studied during the early stages of murine post-implantation [29]. Although it is well accepted that both embryo implantation and early trophoblast invasion involve the two major extracellular proteolytic systems, the plasminogen activators/plasmin and MMPs systems. The individual contribution of proteases and their inhibitors remain to be determined. Several studies have shown that PAI-1 is expressed during the remodelling of maternal tissues associated with human embryo implantation [30-32]. In mice, PAI-1 is essentially produced by spongiotrophoblast and trophoblast giant cells at days 10.5-11.5 dpc [33]. We tested the hypothesis that PAI-1, which is a key player of pathological angiogenesis [34-

36] could contribute to regulate placental, maternal and embryo angiogenesis.

Our data show that PAI-1 gene deletion transiently affects the morphology of the structures involved in placentation: decidua, labyrinth and spongiotrophoblast as well as fetomaternal vessel densities. Lack of PAI-1 resulted at day 10.5 in a reduction of labyrinth thickness and maternal plus foetal vessel densities, as well as in an enlarged decidua. PAI-1 deficiency at day 12.5 resulted in increased spongiotrophoblast width. Normalization of placental morphology was observed at 14.5 dpc, suggesting that compensatory mechanisms take place at latter stages.

Our data provide evidence that PAI-1 contributes to early stages of placenta formation and to the onset of vascularisation. The densities of both maternal and embryonic vessels were reduced in PAI-1^{-/-} mice. The defective vascularisation of the labyrinth is likely to reduce fetomaternal exchanges of gases and nutrients. However, we have previously documented that placental vascularisation is not crucial up to 10 dpc. Since such embryos can remain alive when cultured *in vitro* for 24 hours [37]. The observation that, despite these early placental abnormalities, no intra-uterine growth retardation was observed in mice deficient for PAI-1 [38] suggests that compensatory mechanisms take place. A synergistic effect of serine proteases and matrix metalloproteases (MMPs) have been shown in different physiological remodelling processes such as wound healing [39], embryo implantation and development. In this context, it is worth noting that the inhibition of MMPs alone or the isolated deficiency of plasminogen was not sufficient to affect embryonic growth and placental vascularisation [40]. Interestingly, placental vascularisation was significantly reduced in plasminogen^{-/-} mice treated with a broad spectrum MMP inhibitor (Gallardin) [41]. Exposure of plasminogen^{-/-} mice, but not of WT mice, to Gallardin, resulted in a reduction in labyrinth size and in a placental phenotype that closely resembles the 10.5 dpc placental morphology observed in PAI-1^{-/-} mice. These data demonstrate that a combination of MMPs and plasminogen is essential for the proper development of placenta [42]. Several studies

support the notion that mice that are made genetically deficient for a specific gene may lack specific phenotypes due to molecular overlap and/or to the setting up of compensatory functional mechanisms [43].

During the early phases of placental development, our data indicate that PAI-1 plays a significant role since its deletion results in a significant placental phenotype while MMP inhibition alone is not sufficient to induce an abnormal placental morphology in WT mice [44]. These data suggest that in early placentation, the regulation of plasminogen activation rather than MMP activity is crucial.

Subsequently, PAI-1 expression declines spontaneously in the placenta of WT mice [45]. Its deletion is no longer associated with a change in placental structures and vascularisation that becomes normalized suggesting that, at days 12.5 and later the plasminogen-plasmin activation is less crucial. At this stage, the balance between MMPs and their inhibitors may become more important since a normal placental phenotype is restored at day 14.5 in PAI-1^{-/-} mice. The contribution of serine proteases may however remain important even at this stage, since they are able to compensate the experimental MMPs inhibition [46].

Although PAI-1 is blocking proteolytic activity of uPA and tPA, thereby reducing plasmin formation, the absence of phenotype in plasminogen deficient mice suggests that the action of PAI-1 could not be simply related to a control of plasmin-mediated proteolysis. In this context, impaired vascularisation in the labyrinth layer is probably not related to excessive extracellular matrix protein deposit. Accordingly, immunostainings of fibrin(ogen), collagen III and collagen VI revealed no difference between the two genotypes (data not shown).

In both physiological (the present work) and pathological angiogenesis process, the phenotype associated to PAI-1 deficiency (impaired angiogenesis) is more severe than that observed in plasminogen deficient mice. Indeed, the defect of tumour vascularisation observed in PAI-1^{-/-} mice could not be fully phenocopied by plasminogen deficiency [47].

PAI-1 is a multifunctional molecule known to control not only extracellular matrix

proteolysis, but also cell matrix interaction through binding to vitronectin and cell surface molecules such as integrins and uPA receptor [48-51]. We have previously shown in various *in vivo* and *in vitro* models of angiogenesis that PAI-1 plays a critical angiogenic role mainly through its capacity to tightly control extracellular proteolysis [52]. The necessity of a balance between plasminogen activators and PAI-1, at least in pathological angiogenesis, is supported by recent evidence of a dose-dependent effect of PAI-1 [53-55]. One function of PAI-1 could consist in the protection of angiogenic vascular endothelial cells or other migrating cells by preventing excessive pericellular proteolysis and cellular damage as well as by preserving matrix integrity [56-59]. However, one cannot exclude the possibility that PAI-1 could also regulate adhesive, migratory, and growth properties of invasive cells [56;60;61].

Although PAI-1 mechanism of action remains to be elucidated, our data demonstrate its role during early placentation. Normalization of placental morphogenesis detected at day 14.5 at a time when PAI-1 is no longer expressed in normal mouse pregnancy indicates that placental remodelling and embryo growth become subsequently independent from PAI-1 status. These data emphasize the importance of PAI-1 specifically at early steps of angiogenesis onset as recently described for cancer progression [62].

Altogether, our data show that, despite the unaffected pregnancy outcomes, transient morphological abnormalities at the level of labyrinth, spongiotrophoblast and decidua result from the deficiency of the PAI-1 gene expression at 10.5 and 12.5 dpc. They provide new insights into the unique function of an individual component of plasminogen/plasmin system, PAI-1, in specific steps of placental maternal and foetal vascularisation.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Isabelle Dasoul, Patricia Gavitelli and Fabrice Olivier for their excellent technical assistance.

This work was supported by grants from the Communauté française de Belgique (Actions de Recherches Concertées), the Commission of

European Communities, Cancer degradome, (FP6) Framework Programme 6-NOE n° LSHM-CT-2004-512040 « EMBIC », the Fonds de la Recherche Scientifique Médicale, the Fonds National de la Recherche Scientifique (F.N.R.S., Belgium), the Fonds spéciaux de la Recherche (University of Liège), the Fortis Banque Assurances, the Fondation Léon Fredericq (University of Liège), the D.G.T.R.E. from the « Région Wallonne », the F.S.E. (Fonds Social Européen), the Fonds d'Investissements de la Recherche Scientifique (F.I.R.S., CHU, Liège, Belgium), the Interuniversity Attraction Poles Programme - Belgian Science Policy (Brussels, Belgium).

Reference List

1. Georgiades P, Ferguson-Smith AC, Burton GJ: Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta* 2002;23:3-19.
2. Cross JC, Hemberger M, Lu Y, Nozaki T, Whiteley K, Masutani M, Adamson SL: Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta. *Mol.Cell Endocrinol.* 2002;187:207-212.
3. Brosens JJ, Pijnenborg R, Brosens IA: The myometrial junctional zone spiral arteries in normal and abnormal pregnancies: a review of the literature. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 2002;187:1416-1423.
4. Cross JC, Hemberger M, Lu Y, Nozaki T, Whiteley K, Masutani M, Adamson SL: Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta. *Mol.Cell Endocrinol.* 2002;187:207-212.
5. Salamonsen LA: Role of proteases in implantation. *Rev.Reprod.* 1999;4:11-22.
6. Solberg H, Rinkenberger J, Dano K, Werb Z, Lund LR: A functional overlap of plasminogen and MMPs regulates vascularization during placental development. *Development* 2003;130:4439-4450.

7. Noel A, Maillard C, Rocks N, Jost M, Chabottaux V, Sounni NE, Maquoi E, Cataldo D, Foidart JM: Membrane associated proteases and their inhibitors in tumour angiogenesis. *J.Clin.Pathol.* 2004;57:577-584.
8. Blasi F, Carmeliet P: uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2002;3:932-943.
9. Czekay RP, Loskutoff DJ: Unexpected role of plasminogen activator inhibitor 1 in cell adhesion and detachment. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* 2004;229:1090-1096.
10. Teesalu T, Blasi F, Talarico D: Expression and function of the urokinase type plasminogen activator during mouse hemochorial placental development. *Dev.Dyn.* 1998;213:27-38.
11. Maillard C, Jost M, Romer MU, Brunner N, Houard X, Lejeune A, Munaut C, Bajou K, Melen L, Dano K, Carmeliet P, Fusenig NE, Foidart JM, Noel A: Host plasminogen activator inhibitor-1 promotes human skin carcinoma progression in a stage-dependent manner. *Neoplasia.* 2005;7:57-66.
12. Bajou K, Masson V, Gerard RD, Schmitt PM, Albert V, Praus M, Lund LR, Frandsen TL, Brunner N, Dano K, Fusenig NE, Weidle U, Carmeliet G, Loskutoff D, Collen D, Carmeliet P, Foidart JM, Noel A: The plasminogen activator inhibitor PAI-1 controls in vivo tumor vascularization by interaction with proteases, not vitronectin. Implications for antiangiogenic strategies. *J.Cell Biol.* 2001;152:777-784.
13. Devy L, Blacher S, Grignet-Debrus C, Bajou K, Masson V, Gerard RD, Gils A, Carmeliet G, Carmeliet P, Declerck PJ, Noel A, Foidart JM: The pro- or antiangiogenic effect of plasminogen activator inhibitor 1 is dose dependent. *FASEB J.* 2002;16:147-154.
14. Bajou K, Noel A, Gerard RD, Masson V, Brunner N, Holst-Hansen C, Skobe M, Fusenig NE, Carmeliet P, Collen D, Foidart JM: Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat.Med.* 1998;4:923-928.
15. Noel A, Maillard C, Rocks N, Jost M, Chabottaux V, Sounni NE, Maquoi E, Cataldo D, Foidart JM: Membrane associated proteases and their inhibitors in tumour angiogenesis. *J.Clin.Pathol.* 2004;57:577-584.
16. Bajou K, Masson V, Gerard RD, Schmitt PM, Albert V, Praus M, Lund LR, Frandsen TL, Brunner N, Dano K, Fusenig NE, Weidle U, Carmeliet G, Loskutoff D, Collen D, Carmeliet P, Foidart JM, Noel A: The plasminogen activator inhibitor PAI-1 controls in vivo tumor vascularization by interaction with proteases, not vitronectin. Implications for antiangiogenic strategies. *J.Cell Biol.* 2001;152:777-784.
17. Bajou K, Maillard C, Jost M, Lijnen RH, Gils A, Declerck P, Carmeliet P, Foidart JM, Noel A: Host-derived plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) concentration is critical for in vivo tumoral angiogenesis and growth. *Oncogene* 2004;23:6986-6990.
18. Lambert V, Munaut C, Noel A, Frankenne F, Bajou K, Gerard R, Carmeliet P, Defresne MP, Foidart JM, Rakic JM: Influence of plasminogen activator inhibitor type 1 on choroidal neovascularization. *FASEB J.* 2001;15:1021-1027.
19. Devy L, Blacher S, Grignet-Debrus C, Bajou K, Masson V, Gerard RD, Gils A, Carmeliet G, Carmeliet P, Declerck PJ, Noel A, Foidart JM: The pro- or antiangiogenic effect of plasminogen activator inhibitor 1 is dose dependent. *FASEB J.* 2002;16:147-154.
20. Carmeliet P, Kieckens L, Schoonjans L, Ream B, van Nuffelen A, Prendergast G, Cole M, Bronson R, Collen D, Mulligan RC: Plasminogen activator inhibitor-1 gene-deficient mice. I. Generation by homologous recombination and characterization. *J.Clin.Invest* 1993;92:2746-2755.
21. Carmeliet P, Kieckens L, Schoonjans L, Ream B, van Nuffelen A, Prendergast G, Cole M, Bronson R, Collen D, Mulligan RC: Plasminogen activator inhibitor-1 gene-deficient mice. I. Generation by homologous recombination and characterization. *J.Clin.Invest* 1993;92:2746-2755.
22. Adamson SL, Lu Y, Whiteley KJ, Holmyard D, Hemberger M, Pfarrer C, Cross JC: Interactions between trophoblast cells and the

- maternal and fetal circulation in the mouse placenta. *Dev.Biol.* 2002;250:358-373.
23. Halperin R, Fleminger G, Kraicer PF, Hadas E: Desmin as an immunochemical marker of human decidual cells and its expression in menstrual fluid. *Hum.Reprod.* 1991;6:186-189.
 24. Can A, Tekelioglu M, Baltaci A: Expression of desmin and vimentin intermediate filaments in human decidual cells during first trimester pregnancy. *Placenta* 1995;16:261-275.
 25. Halperin R, Fleminger G, Kraicer PF, Hadas E: Desmin as an immunochemical marker of human decidual cells and its expression in menstrual fluid. *Hum.Reprod.* 1991;6:186-189.
 26. Can A, Tekelioglu M, Baltaci A: Expression of desmin and vimentin intermediate filaments in human decidual cells during first trimester pregnancy. *Placenta* 1995;16:261-275.
 27. Bergese SD, Pelletier RP, Ohye RG, Vallera DA, Orosz CG: Treatment of mice with anti-CD3 mAb induces endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression. *Transplantation* 1994;57:711-717.
 28. Kobayashi TK, Yakushiji M: Gastric carcinoma metastatic to the bone marrow: immunoperoxidase identification of KMO-1 antigen in MGG-destained aspirate. *Diagn.Cytopathol.* 1991;7:597-600.
 29. Cross JC, Werb Z, Fisher SJ: Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science* 1994;266:1508-1518.
 30. Floridon C, Nielsen O, Holund B, Sweep F, Sunde L, Thomsen SG, Teisner B: Does plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) control trophoblast invasion? A study of fetal and maternal tissue in intrauterine, tubal and molar pregnancies. *Placenta* 2000;21:754-762.
 31. Salamonsen LA: Role of proteases in implantation. *Rev.Reprod.* 1999;4:11-22.
 32. Hu ZY, Liu YX, Liu K, Byrne S, Ny T, Feng Q, Ockleford CD: Expression of tissue type and urokinase type plasminogen activators as well as plasminogen activator inhibitor type-1 and type-2 in human and rhesus monkey placenta. *J.Anat.* 1999;194 (Pt 2):183-195.
 33. Teesalu T, Blasi F, Talarico D: Expression and function of the urokinase type plasminogen activator during mouse hemochorial placental development. *Dev.Dyn.* 1998;213:27-38.
 34. Bajou K, Noel A, Gerard RD, Masson V, Brunner N, Holst-Hansen C, Skobe M, Fusenig NE, Carmeliet P, Collen D, Foidart JM: Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat.Med.* 1998;4:923-928.
 35. Lambert V, Munaut C, Noel A, Frankenne F, Bajou K, Gerard R, Carmeliet P, Defresne MP, Foidart JM, Rakic JM: Influence of plasminogen activator inhibitor type 1 on choroidal neovascularization. *FASEB J.* 2001;15:1021-1027.
 36. Gutierrez LS, Schulman A, Brito-Robinson T, Noria F, Ploplis VA, Castellino FJ: Tumor development is retarded in mice lacking the gene for urokinase-type plasminogen activator or its inhibitor, plasminogen activator inhibitor-1. *Cancer Res.* 2000;60:5839-5847.
 37. Foidart JM, Yaar M, Figueroa A, Wilk A, Brown KS, Liotta LA: Abortion in mice induced by intravenous injections of antibodies to type IV collagen or laminin. *Am.J.Pathol.* 1983;110:346-357.
 38. Carmeliet P, Schoonjans L, Kieckens L, Ream B, Degen J, Bronson R, De Vos R, van den Oord JJ, Collen D, Mulligan RC: Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature* 1994;419-424.
 39. Lund LR, Romer J, Bugge TH, Nielsen BS, Frandsen TL, Degen JL, Stephens RW, Dano K: Functional overlap between two classes of matrix-degrading proteases in wound healing. *EMBO J.* 1999;18:4645-4656.
 40. Solberg H, Rinkenberger J, Dano K, Werb Z, Lund LR: A functional overlap of plasminogen and MMPs regulates vascularization during placental development. *Development* 2003;130:4439-4450.
 41. Solberg H, Rinkenberger J, Dano K, Werb Z, Lund LR: A functional overlap of plasminogen and MMPs regulates vascularization during placental development. *Development* 2003;130:4439-4450.

42. Solberg H, Rinkenberger J, Dano K, Werb Z, Lund LR: A functional overlap of plasminogen and MMPs regulates vascularization during placental development. *Development* 2003;130:4439-4450.
43. Constanica M, Hemberger M, Hughes J, Dean W, Ferguson-Smith A, Fundele R, Stewart F, Kelsey G, Fowden A, Sibley C, Reik W: Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature* 2002;417:945-948.
44. Solberg H, Rinkenberger J, Dano K, Werb Z, Lund LR: A functional overlap of plasminogen and MMPs regulates vascularization during placental development. *Development* 2003;130:4439-4450.
45. Teesalu T, Blasi F, Talarico D: Embryo implantation in mouse: fetomaternal coordination in the pattern of expression of uPA, uPAR, PAI-1 and alpha 2MR/LRP genes. *Mech.Dev.* 1996;56:103-116.
46. Solberg H, Rinkenberger J, Dano K, Werb Z, Lund LR: A functional overlap of plasminogen and MMPs regulates vascularization during placental development. *Development* 2003;130:4439-4450.
47. Bajou K, Masson V, Gerard RD, Schmitt PM, Albert V, Praus M, Lund LR, Frandsen TL, Brunner N, Dano K, Fusenig NE, Weidle U, Carmeliet G, Loskutoff D, Collen D, Carmeliet P, Foidart JM, Noel A: The plasminogen activator inhibitor PAI-1 controls in vivo tumor vascularization by interaction with proteases, not vitronectin. Implications for antiangiogenic strategies. *J.Cell Biol.* 2001;152:777-784.
48. Blasi F, Carmeliet P: uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2002;3:932-943.
49. Rakic JM, Maillard C, Jost M, Bajou K, Masson V, Devy L, Lambert V, Foidart JM, Noel A: Role of plasminogen activator-plasmin system in tumor angiogenesis. *Cell Mol.Life Sci.* 2003;60:463-473.
50. Czekay RP, Aertgeerts K, Curriden SA, Loskutoff DJ: Plasminogen activator inhibitor-1 detaches cells from extracellular matrices by inactivating integrins. *J.Cell Biol.* 2003;160:781-791.
51. Deng G, Curriden SA, Hu G, Czekay RP, Loskutoff DJ: Plasminogen activator inhibitor-1 regulates cell adhesion by binding to the somatomedin B domain of vitronectin. *J.Cell Physiol* 2001;189:23-33.
52. Bajou K, Noel A, Gerard RD, Masson V, Brunner N, Holst-Hansen C, Skobe M, Fusenig NE, Carmeliet P, Collen D, Foidart JM: Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat.Med.* 1998;4:923-928.
53. Bajou K, Maillard C, Jost M, Lijnen RH, Gils A, Declerck P, Carmeliet P, Foidart JM, Noel A: Host-derived plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) concentration is critical for in vivo tumoral angiogenesis and growth. *Oncogene* 2004;23:6986-6990.
54. Devy L, Blacher S, Grignet-Debrus C, Bajou K, Masson V, Gerard RD, Gils A, Carmeliet G, Carmeliet P, Declerck PJ, Noel A, Foidart JM: The pro- or antiangiogenic effect of plasminogen activator inhibitor 1 is dose dependent. *FASEB J.* 2002;16:147-154.
55. Lambert V, Munaut C, Carmeliet P, Gerard RD, Declerck PJ, Gils A, Claes C, Foidart JM, Noel A, Rakic JM: Dose-dependent modulation of choroidal neovascularization by plasminogen activator inhibitor type I: implications for clinical trials. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 2003;44:2791-2797.
56. Pepper MS: Positive and negative regulation of angiogenesis: from cell biology to the clinic. *Vasc.Med.* 1996;1:259-266.
57. Carmeliet P, Collen D: Transgenic mouse models in angiogenesis and cardiovascular disease. *J.Pathol.* 2000;190:387-405.
58. Bajou K, Noel A, Gerard RD, Masson V, Brunner N, Holst-Hansen C, Skobe M, Fusenig NE, Carmeliet P, Collen D, Foidart JM: Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat.Med.* 1998;4:923-928.
59. Noel A, Maillard C, Rocks N, Jost M, Chabotiaux V, Soumni NE, Maquoi E, Cataldo D, Foidart JM: Membrane associated proteases

and their inhibitors in tumour angiogenesis. *J.Clin.Pathol.* 2004;57:577-584.

60. Czekay RP, Aertgeerts K, Curriden SA, Loskutoff DJ: Plasminogen activator inhibitor-1 detaches cells from extracellular matrices by inactivating integrins. *J.Cell Biol.* 2003;160:781-791.
61. McMahon GA, Petitelerc E, Stefansson S, Smith E, Wong MK, Westrick RJ, Ginsburg D, Brooks PC, Lawrence DA: Plasminogen activator inhibitor-1 regulates tumor growth and angiogenesis. *J.Biol.Chem.* 2001;276:33964-33968.
62. Maillard C, Jost M, Romer MU, Brunner N, Houard X, Lejeune A, Munaut C, Bajou K, Melen L, Dano K, Carmeliet P, Fusenig NE,

Foidart JM, Noel A: Host plasminogen activator inhibitor-1 promotes human skin carcinoma progression in a stage-dependent manner. *Neoplasia.* 2005;7:57-66.

Chapitre 2. Effets biologiques du traitement local de l'endomètre par un progestatif (le Levonorgestrel)

La contraception utilisant un progestatif à long terme (ex= système intra-utérin à libération de Levonorgestrel «SIU-LNG») peut engendrer des saignements intermenstruels sous forme de «spotting», principalement durant les six premiers mois de son utilisation. On parle de métrorragies dysfonctionnelles. Ces saignements sont la cause principale de l'abandon de ce moyen de contraception chez plus de 25% des femmes (Vekemans, 1995;Vekemans *et al*, 1997). Ces saignements, généralement imprévus, causent de réels problèmes sociaux et réduisent la qualité de vie d'un grand nombre de femmes dans notre société.

La cause de ces saignements utérins semble être multifactorielle. Plusieurs études ont montré la contribution des métalloprotéases (MMPs) (Skinner *et al*, 1999;Vincent *et al*, 1999;Galant *et al*, 2000;Vincent & Salamonsen, 2000;Vincent *et al*, 2000;Chegini *et al*, 2003;Galant *et al*, 2004) et de plusieurs facteurs angiogéniques (Roopa *et al*, 2003;Laoag-Fernandez *et al*, 2003;Mints *et al*, 2005) dans ce désordre. Des anomalies d'expression du récepteur à la progestérone (PR) ou du récepteur aux œstrogènes (ER) peuvent également y jouer un rôle (Critchley *et al*, 1998;Zhu *et al*, 1999). Une angiogenèse défectueuse, une fragilisation des vaisseaux sanguins (Hickey *et al*, 1999;Hickey *et al*, 1999;Rogers *et al*, 2000) ainsi qu'une modification de la densité des micro-vaisseaux peuvent renforcer le phénomène de spotting (Rogers *et al*, 1993;Jondet *et al*, 2005).

Dans ce deuxième chapitre, nous nous sommes focalisés, d'une part, sur l'étude des caractéristiques (nombre, taille et maturation) des vaisseaux sanguins endométriaux. D'autre part, nous avons analysé l'expression de plusieurs MMPs, spécifiquement celles dont l'expression est augmentée au moment des menstruations, telles que les MMP-1, -2, -3, -7, -9, et -12. Cette étude a été réalisée sur deux groupes de femmes exposées à court ou à long terme à un système intra-utérin à libération de Levonorgestrel. Le premier groupe de biopsies provient de femmes ayant bénéficié d'un système intra-utérin à libération de Levonorgestrel (SIU-LNG) pendant une courte période (± 1 mois). On parlera du «groupe LNG court terme». Le second groupe de biopsies provient de femmes ayant utilisé un SIU-LNG pendant une période de 6 mois à 5 ans, on parlera alors dans l'exposé des résultats du «groupe LNG long terme.» Ces groupes LNG seront comparés à des biopsies obtenues durant la phase sécrétoire chez des femmes en cycle spontané.

2.1 Impact du Levonorgestrel sur la vascularisation endométriale en fonction du temps d'exposition

La caractérisation, par un double marquage anti-alpha Smooth Muscle Actine (α -SMA) et anti-von Willebrand Factor (vWF), des vaisseaux sanguins selon la présence (complète ou partielle) ou l'absence de cellules périvasculaires (péricytes et cellules musculaires lisses), nous a permis de les classer en 3 catégories :

- ✓ Les vaisseaux négatifs pour α -SMA, considérés comme immatures.
- ✓ Les vaisseaux présentant un marquage α -SMA discontinu, considérés comme partiellement matures.
- ✓ Les vaisseaux pourvus d'un marquage α -SMA continu, considérés comme matures.

Résumé des résultats

La méthode de quantification sur images binarisées, développée dans notre étude, nous a permis de déterminer pour chaque image binaire, différents paramètres (i) le nombre de sections des vaisseaux par μm^2 , (ii) la surface vasculaire relative, définie comme le pourcentage du tissu occupé par les vaisseaux et (iii) la taille des vaisseaux.

2.1.1 Détermination du nombre de sections de vaisseaux au niveau de l'endomètre après utilisation d'un SIU-LNG

Nos résultats montrent une augmentation significative du nombre de sections de vaisseaux immatures, et partiellement matures, dans le groupe LNG court terme par rapport au groupe contrôle. De même, une augmentation significative mais moins drastique du nombre de sections de ces deux types de vaisseaux a été observée dans le groupe LNG long terme en comparaison au groupe contrôle.

La comparaison des deux groupes LNG montre que le groupe exposé à court terme (1 à 3 mois) au progestatif, présente un nombre de sections de vaisseaux immatures beaucoup plus important que le groupe exposé plus longuement. Cependant, les deux autres types de vaisseaux ne sont pas affectés par la période d'imprégnation au Levonorgestrel.

2.1.2 La surface vasculaire relative est augmentée chez les femmes utilisant un SIU-LNG

La surface vasculaire relative correspond au rapport de la surface des vaisseaux par rapport à la surface du champ analysé. Nos données montrent que cette surface est significativement augmentée pour les vaisseaux immatures dans le groupe LNG court terme et le groupe LNG long terme par rapport au groupe contrôle.

Au niveau de l'endomètre normal, en phase sécrétoire, la surface occupée par les vaisseaux matures est plus importante que celle occupée par les vaisseaux immatures. Après une courte exposition au progestatif, le profil des vaisseaux bascule dans le sens inverse. En effet, dans le groupe exposé au LNG pendant une courte période, la surface relative des vaisseaux immatures augmente de 4 fois par rapport aux contrôles. La surface relative des vaisseaux matures, quant à elle, diminue.

Dans le groupe «LNG long terme», la surface vasculaire relative des vaisseaux immatures est aussi augmentée par rapport au groupe contrôle. On observe également au sein de ce groupe une augmentation significative de la surface vasculaire relative des vaisseaux matures par rapport au groupe «LNG court terme».

2.1.3 L'aire des vaisseaux varie en fonction de la durée d'exposition au progestatif

La comparaison du groupe contrôle au groupe LNG court terme montre que ce dernier présente des vaisseaux significativement plus petits. Cette différence est observée pour les trois types de vaisseaux : immatures, partiellement matures, et matures. Cependant, tous les types de vaisseaux appartenant au groupe LNG long terme sont significativement plus grands en comparaison au groupe contrôle et au groupe LNG court terme.

Conclusions

Dans cette étude, nous nous sommes focalisés sur l'analyse de l'impact du Levonorgestrel sur la vascularisation endométriale. Nous avons déterminé les variations des vaisseaux immatures, partiellement matures, et matures en termes de nombre, d'aire et de surface relative. De même, nous avons comparé l'effet du Levonorgestrel, en imprégnation locale dans l'utérus, sur la vascularisation à deux durées d'exposition : à court terme et à long terme. Cette comparaison nous a permis d'analyser l'évolution de

la maturation des vaisseaux au cours du temps et d'expliquer les saignements qui sont observés majoritairement les six premiers mois, mais aussi les saignements qui peuvent persister plus longtemps chez certaines patientes.

En résumé, nous avons montré le développement d'un grand nombre de vaisseaux immatures, dépourvus de cellules périvasculaires (instables) et de petite taille dans le groupe exposé au progestatif à courte période. Le développement de ce réseau vasculaire serait probablement responsable des saignements qui surviennent les 6 premiers mois après la mise en place d'un stérilet à libération hormonale. Les saignements qui persistent au-delà de 6 mois seraient engendrés aussi par la présence de vaisseaux instables et anormalement dilatés.

Endometrial vessel maturation in women exposed to levonorgestrel-releasing intrauterine system for a short or prolonged period of time

Ravet Stéphanie^{1,†}, Soraya Labied^{1,†}, Silvia Blacher¹, Francis Frankenne¹, Carine Munaut¹, Viviana Fridman², Aude Beliard¹, Jean-Michel Foidart^{1,3,†} and Michelle Nisolle^{1,3,4,†}

¹Laboratory of Tumor and Development Biology, Center of Experimental Cancer Research (CECR), University de Liège, Tour de Pathologie (B23), Avenue de l'hôpital, GIGA-R, Sart-Tilman, B-4000 Liège, Belgium; ²Department of Anatomopathology, Citadelle, University of Liège, B-4000 Liège, Belgium; ³Department of Gynecology, CHU, University of Liège, B-4000 Liège, Belgium

⁴Correspondence address. Laboratory of Tumor and Development Biology, Center of Experimental Cancer Research (CECR), University de Liège, Tour de Pathologie (B23), Avenue de l'hôpital, GIGA-R, Sart-Tilman, B-4000 Liège, Belgium. Tel: +32-4-366-25-69; Fax: +32-4-366-29-36; E-mail: michelle.nisolle@chu.ulg.ac.be

BACKGROUND: Levonorgestrel-releasing intrauterine system (LNG-IUS), although inserted to reduce heavy menstruation, causes irregular early transient bleeding. The objective of the study was to document quantitative changes in endometrial vessels of short- (≤ 3 months) and long-term (≥ 12 months) LNG users. The area, density and maturation of endometrial vessels were quantified in 19 endometrial biopsies of women with LNG-IUS and in 10 normally ovulating patients during mid-luteal phase. **METHODS:** Vessel maturation was evaluated by double immunostaining using anti-von Willebrand factor (endothelial cell marker) and anti-alpha Smooth Muscle Actin (vascular smooth muscle cells) antibodies. Vessel area, number and density were quantified with a novel computer-assisted image analysis system. **RESULTS:** Endometrium exposed to LNG-IUS for 1–3 months displayed a 11.5-fold increase in small naked vessel number. The partially mature vessel (α SMA partially positive) number increased six times. After long-term LNG-IUS treatment, the immature and partially mature vessel number remained four times higher than in the control group. Vessel area and density also increased dramatically in a time-dependent pattern with LNG-IUS use. **CONCLUSIONS:** Levonorgestrel affects blood vessel number, area, density and maturation in a time-dependent pattern that may explain the early transient increase in breakthrough bleeding with the LNG-IUS.

Keywords: endometrium; levonorgestrel; bleeding; vascularization; image analysis

Introduction

Long-term progestin-only contraceptive methods such as the levonorgestrel-releasing intrauterine system (LNG-IUS) lead to irregular and abnormal endometrial spotting and bleeding. This unpredictable breakthrough bleeding (BTB), which causes considerable social discomfort and reduces quality of life, is the most common reason for discontinuation of use in ~25% of women (Vekemans, 1995; Vekemans *et al.*, 1997). It occurs predominantly during the first few months of treatment and then progressively and spontaneously decreases.

The exact mechanism responsible for these bleedings is unknown and the aetiology seems to be multifactorial. Several studies have demonstrated a possible contribution of matrix metalloproteinases (MMPs) (Skinner *et al.*, 1999; Vincent *et al.*, 1999; Galant *et al.*, 2000; Vincent *et al.*, 2002;

Chegini *et al.*, 2003; Galant *et al.*, 2004), tissue factor (TF) (Runic *et al.*, 2000) and granulocyte-macrophage cytokines (Critchley *et al.*, 1998). Anomalies in progesterone and estrogen receptor expression have been also shown to play a role in BTB associated with LNG-IUS (Critchley *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1999).

Modifications in endometrial microvascular density and a decrease in vessel maturation due to a lack of surrounding pericytes and smooth muscle cells may also be involved in this process along with modifications of endothelial basement membrane structure and composition (Rogers *et al.*, 1993; Hickey *et al.*, 1999; Jondet *et al.*, 2005). Following Norplant exposure, a reduction of basement membrane components around the endometrial endothelium has been demonstrated but without any correlation with bleeding episodes (Hickey *et al.*, 1999).

In order to determine the extent of vascular remodelling in endometrium of women exposed to LNG-IUS, we compared,

[†]These authors contributed equally.

in this study, the area, density and maturation of blood vessels after short- or long-term exposure to LNG-IUS.

Materials and Methods

Patients

The study was approved by the Ethical Committee of the University Hospital. Nineteen endometrial biopsies were analysed. Eight biopsies (Group I) were obtained from women exposed to LNG-IUS (Mirena[®], Bayer Schering Pharma, Berlin, Germany) for a period of 1–3 months. In fact, these eight women (mean age 39 years old), with an indication of hysterectomy for benign gynaecological indication, were prospectively recruited. Written informed consent was obtained from each woman and LNG-IUS was inserted into each subject for a median period of 1 month prior to surgery. Eleven biopsies (Group II) were obtained from women with breakthrough bleeding (mean duration of exposure 36 months, range 12–60 months) who required LNG-IUS removal for pregnancy desire or LNG-IUS change. Biopsies were retrieved from the Department of Anatomopathology, University Hospital, Liège, Belgium.

The control group consisted of 10 endometrial biopsies, performed during the mid-secretory phase of a spontaneous documented ovulatory cycle of women with documented fertility. The ages of the women in each group are shown in Table 1. All women in both LNG-IUS groups had presented at least one episode of transient bleeding during the 2 weeks prior to biopsy, whereas no breakthrough bleeding was observed in women with ovulatory cycles.

Table 1. Patients' distribution in short-term LNG, long-term LNG and control groups.

	Control group	LNG-IUS group	
		Short-term LNG (1–3 months)	Long-term LNG (12–60 months)
Patients, <i>n</i>	10	8	11
Age, Mean \pm SD	33.1 \pm 3.1	39.2 \pm 5.7	41.7 \pm 7.4

Endometrial tissues

All biopsies were obtained with a Cornier Pipelle suction curette (C.C.D. International, Paris, France) that allows sampling of the functional layer of the endometrium. Tissue were fixed in 4% formaldehyde solution in phosphate buffer saline (PBS) and embedded in paraffin. Specimens obtained during the mid-secretory phase were classified according to classical criteria (Noyes *et al.*, 1950).

Von Willebrand factor/ α -smooth muscle actin double immunostaining

Serial sections (5 μ m) were mounted on silanized slides and used for immunocytochemistry. The endometrial vasculature was visualized by double immunostaining of endothelial cells and perivascular cells. The primary antibodies (Abs) used were a rabbit polyclonal anti-human von Willebrand factor (vWF, A082, Dako, Denmark) and a mouse monoclonal anti-alpha smooth muscle actin (α SMA, clone 1A4, A2547, Sigma-aldrich, USA). Slides were washed in Tris-HCl, pH 7.6 between all steps unless otherwise stated. Endogenous peroxidase was blocked with 3% H₂O₂ for 20 min at room temperature (RT). Slides were incubated with normal sheep serum (NSS) (Hormonology laboratory, Marloie, Belgium) for 30 min at RT, directly

followed by vWF Ab (1/500 in NSS/Tris 10%) overnight at 4°C. A swine anti-rabbit immunoglobulin conjugated to peroxidase (P0217, Dako, Denmark) was used as a secondary Ab. DAB+ (Liquid DAB+ substrate chromogen system, K3468, Dako, Denmark) was applied for 15 min at RT in the dark as a chromogen and sections were rinsed in H₂O. Slides were incubated with normal goat serum (NGS) (Hormonology laboratory, Marloie, Belgium) before being incubated with the second primary Ab, α SMA (1/400 in NGS/Tris 10%) for 90 min at 37°C. A goat anti-mouse Ab conjugated to biotin (E 0433, Dako, Denmark) diluted 1/400 in Tris buffer for 30 min at RT was used as a secondary Ab, followed by an incubation for 30 min at RT with streptavidine-alkaline phosphatase (D 0396, Dako, Denmark) diluted 1/500. Finally, Fast Red chromogen system (K4016, Dako, Denmark) was applied for 10 min at RT in the dark. Sections were rinsed in H₂O and mounted in Aqua Polymount (Polysciences, Inc., Warrington, PA, USA). Negative controls were performed by replacing each primary Ab with normal serum.

Myosin heavy chain staining

Serial sections were stained either with α SMA or myosin heavy chain (MHC) Abs in order to compare the relative distribution, and to quantify the proportion, of α SMA positive vessel sections that also reacted with the anti-MHC Ab.

The MHC was visualized by the following steps. First, slides were incubated with proteinase K (50 μ g/ml) diluted in Tris-HCl for 10 min at 37°C, and then slides were heated in a microwave oven set at 1.4 bar and 126°C for 11 min in target retrieval buffer (M3558, DAKO, Denmark). Endogenous peroxidase was blocked in 3% H₂O₂ for 20 min at RT, and an incubation with mouse anti-human MHC Ab (M3558, DAKO, Denmark) diluted 1/100 was conducted 60 min at RT. Sections were washed in PBS (5 \times 5 min) before incubation with the appropriate secondary Ab (goat anti-mouse, P0217, DAKO, Denmark) conjugated to biotin diluted 1/400, for 30 min, at RT. Finally, sections were incubated for 30 min with Streptavidine conjugated to HRP, diluted 1/500 for 30 min at RT and staining was revealed with the DAB system.

Staining of the argyrophilic fibrillar network

Silver impregnation of histological sections was performed as previously described (Gordon and Sweets, 1936).

Image analysis and measurement

Slides were observed with an Olympus microscope (Omnilabo, Aartselaar, Belgium) and the entire section [mean area 78.73 mm² (range 22.90–163.07 mm²)] was analysed at magnification of \times 400 by two observers (S.L. and S.R.). As described by Rogers *et al.* (2000), a score (0, 1 or 2) was attributed to blood vessels according to the intensity of α SMA staining. A score of 0 represents absence of α SMA, score 1 represents irregular α SMA distribution around part of the vessel circumference and score 2 indicates a positive continuous staining of the entire vessel circumference (Fig. 1). The entire endometrial tissue sections were analysed by counting vessels in 20–100 consecutive fields covering the entire endometrial area.

The contour of each vessel type was drawn manually at \times 400 magnification using Photoshop software by three different colours: turquoise for score 0, blue for score 1, red for score 2 and green for tissue boundaries (Fig. 2A). Then, the colour image was decomposed into its three components: red (R), green (G) and blue (B) (Russ, 1999a and b). For example, in R image, components corresponding to vessels scored 2 were strongly contrasted. Each of the R, G and B image component was therefore processed independently in order to obtain a binary image in which pixels belonging to vessels were

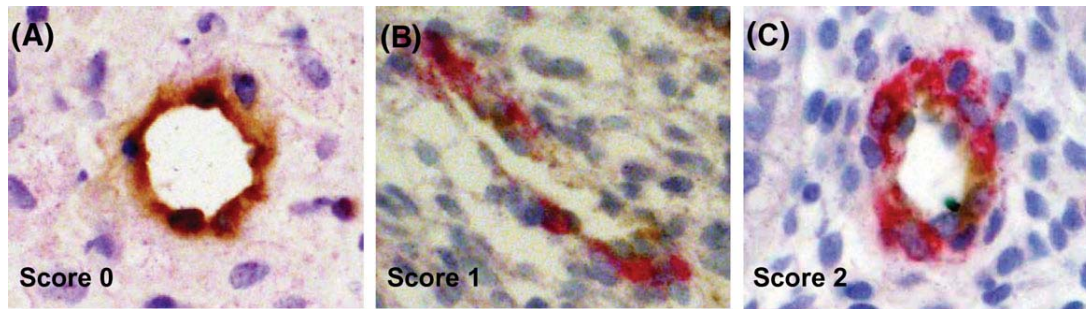


Figure 1: Illustration of α SMA immunostaining scoring
 α SMA positive cells were labelled in red and endothelial cells were stained in brown with an anti-vWF Ab. (A) Score 0 vessels are α SMA negative, (B) score 1 vessels display discontinuous α SMA staining and (C) score 2 vessels have continuous α SMA staining. Original magnification $\times 400$

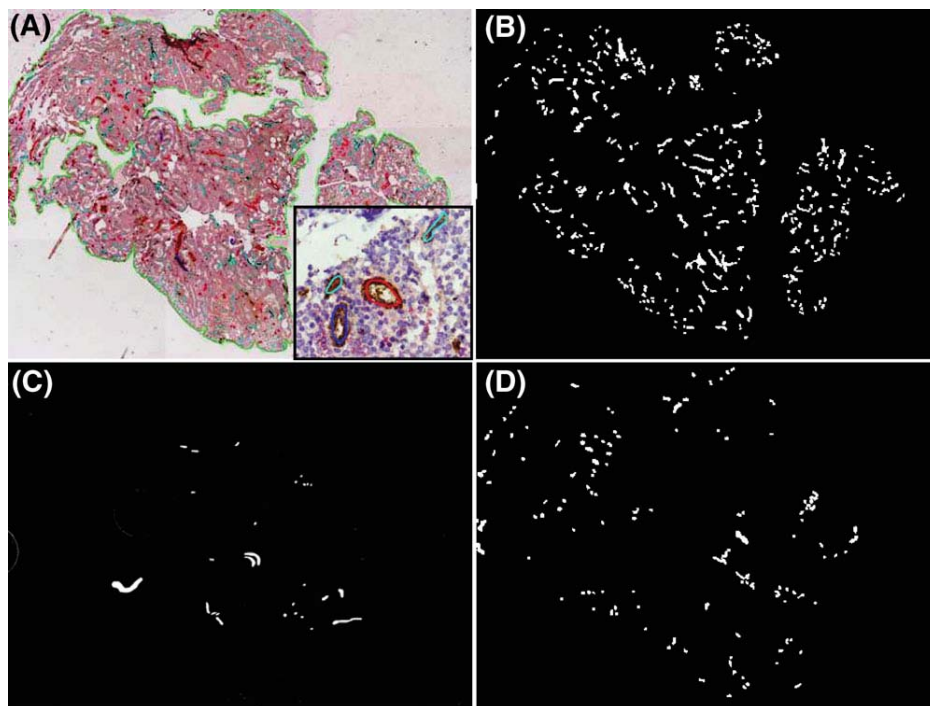


Figure 2: Image analysis and vessel quantification
 (A) The contour of each type of vessel was drawn manually in the original image by the following different colours: turquoise for vessels scored 0, blue for vessels scored 1 and red for vessels scored 2. Green delineates the area of tissue in which measurements are performed. (B) Binary images of score 0 vessels, (C) binary image of score 1 vessels and (D) binary image of score 2 vessels contained in the original image

attributed a value 1 (white) and pixels belonging to the background were attributed a null value (black). Figure 2B–D shows binary images of vessels scored 0, 1 and 2, respectively.

For each binary image, the following parameters were determined: number of vessel sections, vessel area (μm^2) and tissue area (μm^2). Image processing and measurements were performed with the software Aphelion 3.2 from Adsis (France) on a PC.

Statistic analysis

The number and area of vessels, as well as the corresponding area of tissue measured on each image, were analysed in the following two different ways: (i) vessel number per unit of tissue area (n/mm^2) and relative vascular area defined as the proportion of tissue area occupied by the vessels (%) were calculated for each image individually. Then, the mean value of these parameters was determined for each

patient. Finally, the mean \pm SEM vessel number per unit of tissue area and the relative vascular area for all patients of the same group were determined. (ii) The vessel number per unit of tissue area and the relative vascular area were calculated for each patient. To do this, the number (or the area) of vessels measured on all five images of a patient were added and divided by the sum of the area of the tissue in the same five images. This gives only one value of the vessel number per unit of tissue area and of the relative vascular area by patient. Finally, the mean \pm SEM of those parameters was calculated for all the patients of the same group. As the area of the tissue considered on each image was not the same, the two calculations do not coincide exactly but follow closely the same trends, which suggest that the spatial distribution of vessels is rather homogeneous. Then, for the sake of simplicity, only the results obtained with the first method are discussed in the present paper. Relative vascular area and

relative vessel number were represented as a percentage for each vessel category, calculated from values determined according to the method (i).

Analyses for statistical significance were evaluated with non-parametric methods. Kruskal–Wallis test with Dunn’s correction for multiple comparisons was first applied. Then, for the cases in which significant differences were found between two groups, Mann–Whitney U-test was used to confirm this difference. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

Stromal breakdown and fiber lysis

Stromal breakdown occurring in women with endometrial breakthrough bleeding (BTB) (Galant *et al.*, 2000; Kokorine *et al.*, 1996) was documented by staining of argyrophilic fibrillar network using silver impregnation. Focal lysis of the collagen-rich fibrillar network was observed in all biopsies obtained after LNG-IUS use in the short- and long-term LNG groups but in none of those obtained from the control group (Fig. 3). This was consistent with the mild bleeding reported by women incorporated in the study. The area of stromal breakdown represented $\leq 5\%$ of total tissue area. The mean number of vessel sections/mm² in such areas was reduced by 40–70% (data not shown). Therefore all subsequent evaluation of vessel characteristics was performed in intact zones.

Vessel characterisation

Three types of endometrial vessels were identified by double vWF– α SMA immunostaining. (i) Vascular endothelial cells that react with the anti-human vWF were the only cell types in some vessels (Fig. 1A—Score 0). (ii) Vessels coated with a discontinuous layer of pericytes identified by their α SMA content (Fig. 1B—Score 1). (iii) A continuous layer of α SMA positive cells surrounded by another fraction of vessel sections (Fig. 1C—Score 2).

In addition, we compared distribution of α SMA and MHC in vascular pericytes, since the former is a marker of smooth muscle cell differentiation, although the presence of myosin correlates with a functional contractile competence of vessels (Rogers and Abberton, 2003; Abberton *et al.*, 1999). Myosin distribution closely correlates with α SMA pattern in endometrial vessels of the three groups (Fig. 4A). Quantitative evaluation indicated that $\sim 70\%$ of vessels coated with pericytes (α SMA positive) also contained myosin and were

contractile (Fig. 4B). This percentage was identical among the three groups of women.

The number of vessel sections is increased in endometrium of LNG-IUS users

The number of vessel sections per mm² was counted by a novel computer assisted method from binary structure after image transformation. In total, 11 093 vessel sections were counted for the three groups (Fig. 5). A statistically significant increase in vessel section number of immature ($11.5\times$) ($P = 0.0002$) and partially mature ($6\times$) ($P = 0.0018$) vessels was observed in short-term treated patients (Group I) compared with control group. Less dramatic was the increase in the number of immature ($4\times$) ($P = 0.004$) and partially mature ($4\times$) ($P = 0.001$) vessels observed after long-term LNG-IUS use (Group II) compared with control group (Fig. 5). The vessel section number of mature vessels/mm² was significantly decreased after short- or long-term exposure to LNG ($P < 0.0001$) compared with the control group (Fig. 5). Comparison between the long- and short-term LNG groups shows an increased vascularization in short-term LNG users, which is mainly associated with the development of naked vessels. The number of vessel sections of partially mature and mature vessels was not different between the short and long duration of LNG-IUS treatment.

The relative vascular area is increased in endometrium from women treated with levonorgestrel

The relative vascular area, corresponding to the ratio of vessel surface to the total tissue area, was significantly increased in endometrium of LNG users (Group I and II) when compared with the control group. This significant increase was observed for naked (pericytes-free) vessels scored 0 in the short-term LNG group ($P < 0.0001$) and long-term LNG group ($P = 0.0015$). The relative vascular area of mature vessels decreased in short-term LNG group when compared with the control ($P < 0.0001$) and long-term LNG groups ($P = 0.0002$) (Fig. 6A).

The duration of LNG exposure also dramatically influenced the extent of vascularization and vessel maturation. Although α SMA-coated vessels (score 2) were the most prevalent vessels in control group, short-term exposure to LNG-IUS caused a 4-fold increase of naked (α SMA negative) vessel area. The relative vascular area of these immature vessels became the predominant vessel type, whereas partially

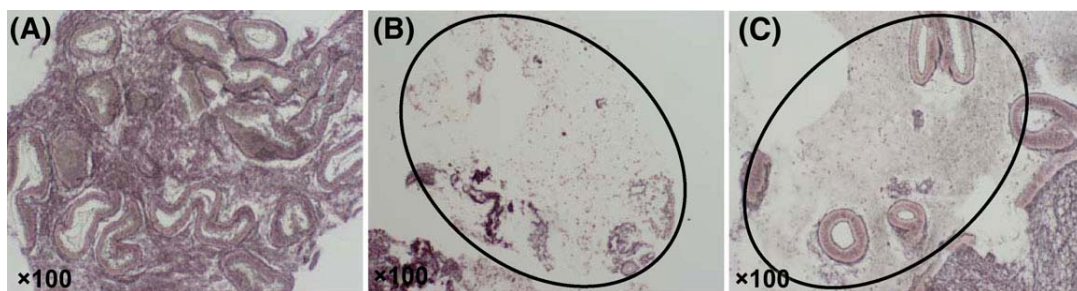


Figure 3: Focal stromal breakdown and lysis of the collagen-rich argyrophilic fibrillar network observed using silver impregnation Control group (A) short-term LNG group (delimited zone) (B) and long-term LNG group (delimited zone) (C) Original magnification $\times 100$

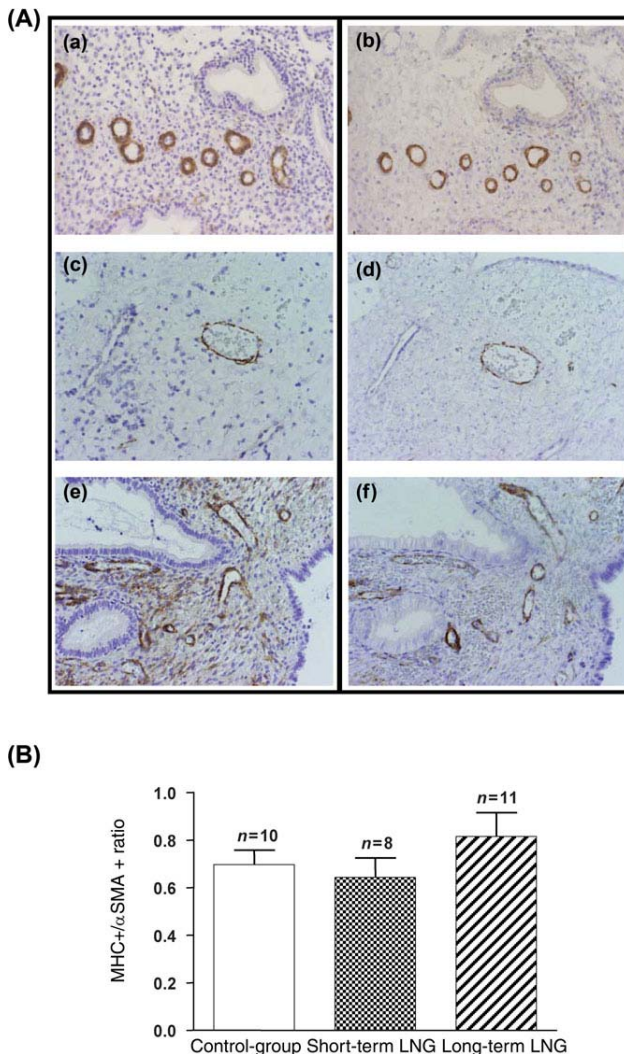


Figure 4: Staining of α SMA (a,c,e) and MHC (b,d,f) on serial sections in Control group (a,b), short-term LNG group (c,d) and long-term LNG group (e,f). (A) Original magnification $\times 200$. (B) Ratio of number vessel sections with positive MHC staining on total number of vessel sections with positive α SMA staining in Control group ($n = 10$), short-term LNG group ($n = 8$) and long-term LNG group ($n = 11$)

mature and mature vessel areas became less prevalent after 1 month of treatment. This change in the pattern of endometrial vascularization in short-term treatment could promote vessel leakage and rupture and may explain the transient unwanted spotting and bleeding frequently reported after short-term LNG use. After prolonged treatment, the relative vessel area of naked vessels (score 0) decreased in comparison with that in short-term users (Fig. 6A).

The degree of vessel maturity was different among the three groups. The percentage of the total vascular area occupied by immature vessels (devoid of pericytes) was considerably higher in short-term LNG-IUS users (Group I) than in control group ($P < 0.0001$) (Fig. 6B). No difference was shown in the proportion of total vascular area occupied by partially mature vessels (score 1) between the three groups. A significant

decrease was observed in the proportion of mature vessels (score 2) in the short-term LNG group when compared with the control group ($P < 0.0001$) or the long-term LNG group ($P = 0.0002$) (Fig. 6B).

Vessel area varies according to the duration of treatment with LNG-IUS

The mean vessel surfaces were determined by a computer assisted method for each category of vessels in both LNG groups and the control group (Fig. 7). Immature, partially mature and mature vessels were smaller in short-term LNG users when compared with the control group ($P < 0.0001$). In contrast, larger vessels were observed in long-term LNG users, compared with the short-term LNG and control group ($P < 0.0001$). However, the proportion of vessels coated with pericytes increased progressively with time, indicating a trend towards a normalization of vessel structure.

Discussion

Characteristics of endometrial vessels have not been thoroughly documented in women with short- or long-term exposure to LNG-IUS.

LNG-IUS is an intrauterine contraceptive system, also licensed for the treatment of menorrhagia. The system increases apoptosis of the endometrial glands (Maruo *et al.*, 2001) and promotes decidualization of the stroma (Silverberg *et al.*, 1986). It reduces menstrual blood loss (Andersson and Rybo, 1990; Gupta *et al.*, 2006) and its efficacy in the medical management of dysfunctional uterine bleeding is similar to that of endometrial resection (Gupta *et al.*, 2006). Despite this beneficial effect on menstrual blood loss, compliance is hampered because of the initial troublesome side effect of breakthrough bleeding commonly seen during the first 1–6 months after insertion of the LNG-IUS (Lahteenmaki *et al.*, 1998).

Several factors contribute to BTB and their down- or up-regulation is a determinant for activation and maintenance of bleeding. Progesterone receptor (PR) and estrogen receptors (ER) expression is dramatically reduced in epithelial and stromal cells of LNG-IUS users endometrium (Zhu *et al.*, 1999; Jones and Critchley, 2000; Galant *et al.*, 2004; Vereide *et al.*, 2006). Our immunohistochemical study of PR expression also showed a significant down-regulation in short- and long-term LNG groups compared to a control group (data not shown). Our findings are thus in accordance with the previous studies. The decreased levels of PR may contribute to the contraceptive efficacy of this type of IUS but also to LNG-IUS-induced irregular bleeding. Vessel structure and integrity are indeed altered by progestin use, with changes in the shape, dilatation, the basement membrane components and pericyte support of vessels (Hickey *et al.*, 2000; Hickey and Fraser, 2003). Perivascular cells and, in particular, pericytes provide structural stability and play a key role in blood vessel maturation during angiogenesis (Hanahan, 1997; Kohnen *et al.*, 2000; Carmeliet, 2004). It has been proposed that, in women with BTB, there is an increased endometrial vascular fragility, leading to increased susceptibility to damage and rupture (Hickey *et al.*, 2000). This concept is

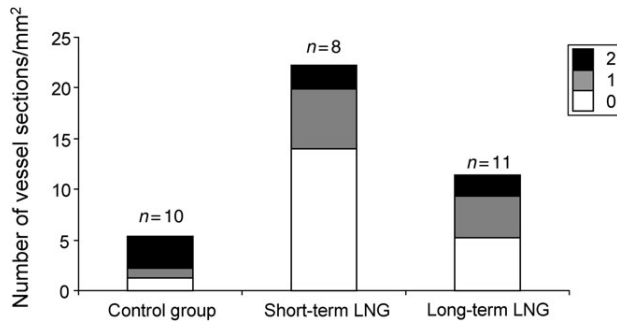


Figure 5: Proportion of vessel number/mm² in short-term LNG group ($n = 8$) and long-term LNG group ($n = 11$) compared with control group ($n = 10$)

Each vessel category was represented as the percentage in each group

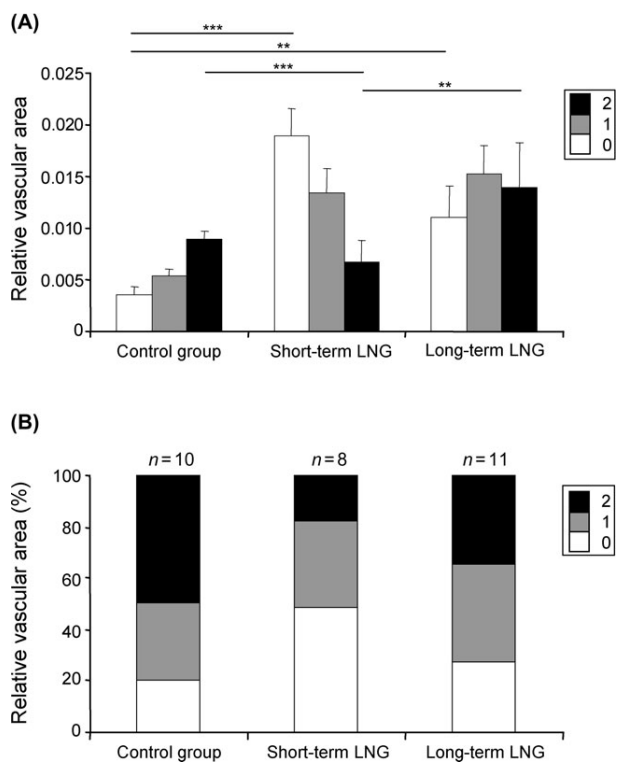


Figure 6: Relative vasculature area and percentage of each vessel category

(A) Relative vasculature area defined as the ratio between the vessel surface to total tissue area, in endometrium, in short-term LNG group ($n = 8$) and long-term LNG group ($n = 11$) compared with control group ($n = 10$) (** $P \leq 0.001$; *** $P \leq 0.0001$). (B) Percentage of each vessel category in control group, short-term LNG group and long-term LNG group

supported by the finding that pericytes are reduced around microvessels in the endometrium of women using progestin-only contraception who suffer from BTB compared with those without BTB (Rogers *et al.*, 2000).

Changes in vessel density with the associated decrease in the stromal support have also been hypothesized to contribute to vascular fragility and BTB (Hickey *et al.*, 2000; Rogers *et al.*, 2000; Jondet *et al.*, 2005). Finally, a decreased

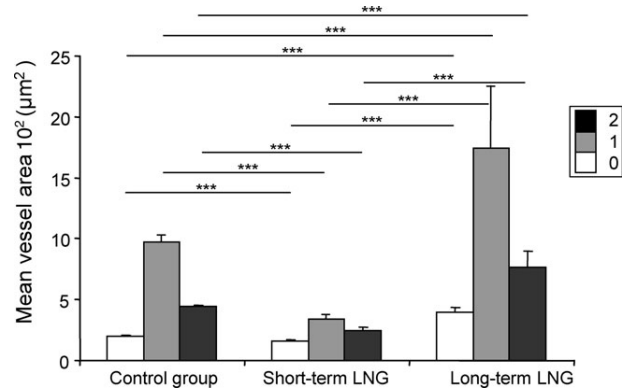


Figure 7: Mean vessel surfaces (μm^2) were determined by computer assisted method for each category of vessels in short-term LNG group ($n = 8$), long-term LNG group ($n = 11$) and the control group ($n = 10$) (** $P \leq 0.001$)

expression of myosin has been documented in arterioles of women suffering from menorrhagia (Abberton *et al.*, 1999; Girling and Rogers, 2005). This decreased vascular smooth muscle cells (VSMCs) differentiation results in a lack of contractile activity and could participate to the pathogenesis of BTB.

In the present study, we analyzed the vasculature of endometrium under the influence of LNG-IUS for a short or a long period of time. Endometrial angiogenesis in LNG users results indeed in an extensive network of small naked or incompletely αSMA -coated vessels. Short-term LNG-IUS use was associated with a dramatic increase in the number of small naked and partially αSMA -coated vessels/mm² (respectively, 11.5 and 6 times). The total tissue area occupied by these vessels was also considerably increased (respectively, 6 and 2.5 times). Altogether, our quantitative data provide a rationale for the excessive bleeding and spotting documented in these patients. Our data are in accordance with the observation of McGavigan *et al.* (2003) who have shown an increase in blood vessel density after a short-term exposure to LNG-IUS (McGavigan *et al.*, 2003).

In this study, long-term LNG use was associated with a significant decrease in the number of naked vessels in comparison with short-term LNG use. The relative vascular area of immature naked vessels was also reduced, whereas that of mature vessels was increased in comparison with short-term users. Despite this progressive trend towards normalization of vessel structure, all vessels became larger after long-term use. This may also contribute to explain the unwanted BTB that may persist in some women, even after prolonged exposure.

Hague *et al.* (2002) also previously showed an enhanced vascular density in long-term LNG users (Hague *et al.*, 2002), but did not discriminate between vessel types. Other studies have demonstrated changes similar to those described in our study in endometrium of women subcutaneously implanted with Norplant (Rogers *et al.*, 1993; Hickey *et al.*, 1999). An increase in total endometrial vessel density and an increase of negative αSMA vessels were described by Rogers *et al.* (1993; 2000). These congruent data strongly suggest that the vascular

changes observed in our analysis can be attributed to the progestin present in the LNG-IUS rather than to an IUD effect. Indeed, copper IUDs classically do not elicit the histological changes described here and in Norplant users (Sheppard, 1987).

Jondet *et al.* (2005) found a reduction of microvessel number with a concomitant dilatation in LNG-IUS users. They failed to discriminate maturation between vessel types which appears in this study to be a key parameter to attempt to correlate blood vessel changes with clinical features of bleeding. Angiogenesis in the endometrium involves the development of arterioles and elaboration of a capillary network. These events of maturation of arterioles involve a regulated VSMC differentiation, i.e. reduced by progestin. In endometrium of menorrhagic women, MHC expression was found to be reduced in VSMC of spiral arterioles. (Abberton *et al.*, 1999). In this study, in each group, ~70% of all α SMA positive vessels also expressed the contractile myosin suggesting that changes in the contractile phenotypes are not responsible for the increased bleeding of these women.

Altogether, our results show that LNG exposition leads to (i) a rapid increase of the number and area of sections of fragile naked vessels, (ii) the formation of smaller vessels after 1–3 months of treatment for all vessel categories and (iii) the enlargement of naked, partially mature and mature vessels after long-time exposure. These data support the clinical use of strategies that may minimize vascular morphology changes. Recently, Critchley *et al.* (2006) proposed an intermittent antiprogestin treatment during the first 3 months coincident with the highest bleeding and vascular fragility. Future approaches should be considered to limit these effects of progestogen on the endometrial blood vessel remodelling.

Acknowledgements

We thank Professor Agnès Noël for scientific advice. We also thank Isabelle Dasoul, Patricia Gavitelli and Emilie Feyereisen for their excellent technical assistance. This work was supported by grants from the Communauté française de Belgique (Actions de Recherches Concertées), the Commission of European Communities, NOE no LSHM-CT-2004-512040 'EMBC', the Fonds de la Recherche Scientifique Médicale, the Fonds National de la Recherche Scientifique (F.N.R.S., Belgium), the Fonds spéciaux de la Recherche (University of Liège), the Fondation Léon Fredericq (University of Liège), the D.G.T.R.E. from the 'Région Wallonne', the F.S.E. (Fonds Social Européen), the Fonds d'Investissements de la Recherche Scientifique (F.I.R.S., CHU, Liège, Belgium) and the Interuniversity Attraction Poles Programme, Belgian Science Policy (Brussels, Belgium).

References

Abberton KM, Healy DL, Rogers PA. Smooth muscle alpha actin and myosin heavy chain expression in the vascular smooth muscle cells surrounding human endometrial arterioles. *Hum Reprod* 1999;**14**:3095–3100.

Andersson JK, Rybo G. Levonorgestrel-releasing intrauterine device in the treatment of menorrhagia. *Br J Obstet Gynaecol* 1990;**97**:690–694.

Carmeliet P. Manipulating angiogenesis in medicine. *J Intern Med* 2004;**255**:538–561.

Chegini N, Rhoton-Vlasak A, Williams RS. Expression of matrix metalloproteinase-26 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-3 and -4 in endometrium throughout the normal menstrual cycle and alteration in users of levonorgestrel implants who experience irregular uterine bleeding. *Fertil Steril* 2003;**80**:564–570.

Critchley HO, Wang H, Jones RL, Kelly RW, Drudy TA, Gebbie AE, Buckley CH, McNeilly AS, Glasier AF. Morphological and functional features of endometrial decidualization following long-term intrauterine levonorgestrel delivery. *Hum Reprod* 1998;**13**:1218–1224.

Critchley HO, Kelly RW, Baird DT, Brenner RM. Regulation of human endometrial function: mechanisms relevant to uterine bleeding. *Reprod Biol Endocrinol* 2006;**4**(Suppl 1):S5.

Galant C, Vekemans M, Lemoine P, Kokorine I, Twagirayezu P, Henriot P, Picquet C, Rigot V, Eeckhout Y, Courtoy PJ *et al.* Temporal and spatial association of matrix metalloproteinases with focal endometrial breakdown and bleeding upon progestin-only contraception. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;**85**:4827–4834.

Galant C, Berliere M, Dubois D, Verougstraete JC, Charles A, Lemoine P, Kokorine I, Eeckhout Y, Courtoy PJ, Marbaix E. Focal expression and final activity of matrix metalloproteinases may explain irregular dysfunctional endometrial bleeding. *Am J Pathol* 2004;**165**:83–94.

Girling JE, Rogers PA. Recent advances in endometrial angiogenesis research. *Angiogenesis* 2005;**8**:89–99.

Gordon H, Sweets HH, Jr. A simple method for the silver impregnation of reticulum. *Am J Pathol.* 1936;**12**:545–551.

Gupta B, Mittal S, Misra R, Deka D, Dadhwal V. Levonorgestrel-releasing intrauterine system vs. transcervical endometrial resection for dysfunctional uterine bleeding. *Int J Gynaecol Obstet* 2006;**95**:261–266.

Hague S, MacKenzie IZ, Bicknell R, Rees MC. In-vivo angiogenesis and progestogens. *Hum Reprod* 2002;**17**:786–793.

Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 1997;**277**:48–50.

Hickey M, Fraser I. Human uterine vascular structures in normal and diseased states. *Microsc Res Tech* 2003;**60**:377–389.

Hickey M, Simbar M, Markham R, Young L, Manconi F, Russell P, Fraser IS. Changes in vascular basement membrane in the endometrium of Norplant users. *Hum Reprod* 1999;**14**:716–721.

Hickey M, Dwarte D, Fraser IS. Superficial endometrial vascular fragility in Norplant users and in women with ovulatory dysfunctional uterine bleeding. *Hum Reprod* 2000;**15**:1509–1514.

Jondet M, Letellier B, Verdys MT. Endometrial vascularization in levonorgestrel intrauterine device users; computerized microvessel measurement study. *Contraception* 2005;**71**:60–64.

Jones RL, Critchley HO. Morphological and functional changes in human endometrium following intrauterine levonorgestrel delivery. *Hum Reprod* 2000;**15**(Suppl 3):162–172.

Kohnen G, Campbell S, Jeffers MD, Cameron IT. Spatially regulated differentiation of endometrial vascular smooth muscle cells. *Hum Reprod* 2000;**15**:284–292.

Kokorine I, Marbaix E, Henriot P, Okada Y, Donnez J, Eeckhout Y, Courtoy PJ. Focal cellular origin and regulation of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) are related to menstrual breakdown in the human endometrium. *J Cell Sci* 1996;**109**:2151–2160.

Lahteenmaki P, Haukkamaa M, Puolakka J, Riikonen U, Sainio S, Suvisaari J, Nilsson CG. Open randomised study of use of levonorgestrel releasing intrauterine system as alternative to hysterectomy. *BMJ* 1998;**316**:1122–1126.

Maruo T, Laoag-Fernandez JB, Pakarinen P, Murakoshi H, Spitz IM, Johansson E. Effects of the levonorgestrel-releasing intrauterine system on proliferation and apoptosis in the endometrium. *Hum Reprod* 2001;**16**:2103–2108.

McGavigan CJ, Dockery P, Metaxa-Mariatou V, Campbell D, Stewart CJ, Cameron IT, Campbell S. Hormonally mediated disturbance of angiogenesis in the human endometrium after exposure to intrauterine levonorgestrel. *Hum Reprod* 2003;**18**:77–84.

Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril* 1950;**1**:3–25.

Rogers PA, Abberton KM. Endometrial arteriogenesis: vascular smooth muscle cell proliferation and differentiation during the menstrual cycle and changes associated with endometrial bleeding disorders. *Microsc Res Tech* 2003;**60**:412–419.

Rogers PA, Au CL, Affandi B. Endometrial microvascular density during the normal menstrual cycle and following exposure to long-term levonorgestrel. *Hum Reprod* 1993;**8**:1396–1404.

Rogers PA, Plunkett D, Affandi B. Perivascular smooth muscle alpha-actin is reduced in the endometrium of women with progestin-only contraceptive breakthrough bleeding. *Hum Reprod* 2000;**15**(Suppl 3):78–84.

Runic R, Schatz F, Wan L, Demopoulos R, Krikun G, Lockwood CJ. Effects of Norplant on endometrial tissue factor expression and blood vessel structure. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;**85**:3853–3859.

- Russ JC. *Image measurements. The image processing Handbook*, Florida, 1999a, pp. 509–574.
- Russ JC. *Processing binary images. The Image Processing Handbook*, 3rd edn., Florida, 1999b, pp. 431–508.
- Sheppard BL. Endometrial morphological changes in IUD users: a review. *Contraception* 1987;**36**:1–10.
- Silverberg SG, Haukkamaa M, Arko H, Nilsson CG, Luukkainen T. Endometrial morphology during long-term use of levonorgestrel-releasing intrauterine devices. *Int J Gynecol Pathol* 1986;**5**:235–241.
- Skinner JL, Riley SC, Gebbie AE, Glasier AF, Critchley HO. Regulation of matrix metalloproteinase-9 in endometrium during the menstrual cycle and following administration of intrauterine levonorgestrel. *Hum Reprod* 1999;**14**:793–799.
- Vekemans M. Use of long-acting contraceptives. *Lancet* 1995;**346**:1165.
- Vekemans M, Delvigne A, Paesmans M. Continuation rates with a levonorgestrel-releasing contraceptive implant (Norplant). A prospective study in Belgium. *Contraception* 1997;**56**:291–299.
- Vereide AB, Kaino T, Sager G, Arnes M, Orbo A. Effect of levonorgestrel IUD and oral medroxyprogesterone acetate on glandular and stromal progesterone receptors (PRA and PRB), and estrogen receptors (ER-alpha and ER-beta) in human endometrial hyperplasia. *Gynecol Oncol* 2006;**101**:214–223.
- Vincent AJ, Malakooti N, Zhang J, Rogers PA, Affandi B, Salamonsen LA. Endometrial breakdown in women using Norplant is associated with migratory cells expressing matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B). *Hum Reprod* 1999;**14**:807–815.
- Vincent AJ, Zhang J, Ostor A, Rogers PA, Affandi B, Kovacs G, Salamonsen LA. Decreased tissue inhibitor of metalloproteinase in the endometrium of women using depot medroxyprogesterone acetate: a role for altered endometrial matrix metalloproteinase/tissue inhibitor of metalloproteinase balance in the pathogenesis of abnormal uterine bleeding? *Hum Reprod* 2002;**17**:1189–1198.
- Zhu P, Liu X, Luo H, Gu Z, Cheng J, Xu R, Lian S, Wu S, Wang J. The effect of a levonorgestrel-releasing intrauterine device on human endometrial oestrogen and progesterone receptors after one year of use. *Hum Reprod* 1999;**14**:970–975.

Submitted on March 12, 2007; resubmitted on May 16, 2007; accepted on June 27, 2007

2.2 Impact du Levonorgestrel sur l'expression des métalloprotéases

Dans le chapitre (III) de l'introduction, nous avons rappelé le rôle crucial joué par les MMPs dans les remaniements cycliques de l'endomètre, et notamment, dans les modifications majeures associées à la période prémenstruelle.

L'expression de l'ensemble de ces enzymes au niveau de l'endomètre, après une imprégnation locale avec le Levonorgestrel n'est connue que de manière fragmentaire. Des travaux du laboratoire ont déjà établi une carte d'expression des transcrits de l'ensemble des MMPs par l'endomètre au cours du cycle menstruel (Goffin *et al*, 2003). Cette étude a montré que les MMP-1, -3, -8, -9 et -12 sont uniquement exprimées au moment des menstruations. Les MMP-2, -7, -11, et -14, quant à elles, sont exprimées tout au long du cycle, mais l'expression de leurs transcrits est augmentée pendant la phase menstruelle. Contrairement aux autres métalloprotéases, l'expression de l'ARNm de la MMP-26 diminue durant cette phase.

Sur base de ces résultats, nous avons orienté cette partie de nos travaux vers l'évaluation du taux d'expression des MMPs régulées au moment des menstruations, sur des biopsies endométriales imprégnées de Levonorgestrel.

Dans le but d'identifier les MMPs intervenant dans les saignements qui apparaissent les premiers mois après insertion du dispositif intra-utérin, et ceux qui persistent plus longtemps, nous avons réalisé notre analyse, comme pour l'étude précédente, sur 2 groupes de femmes exposées à court et à long terme à un SIU-LNG.

Résumé des résultats

2.2.1 Régulation de l'expression des MMPs menstruelles au niveau de l'endomètre après une exposition au Levonorgestrel

Dans un premier temps nous avons analysé, par RT-PCR, l'expression des transcrits des MMP-1, -2, -3, -7, -9, -12 et -26 dans des biopsies endométriales de femmes prélevées durant la phase sécrétoire (groupe contrôle), ou dans des biopsies endométriales de femmes ayant bénéficié d'un SIU-LNG. Nos résultats montrent que l'expression des MMP-1, -2, -3, -7, -9 et -12 est significativement augmentée chez les femmes sous progestatif, contrairement à la MMP-26, dont l'expression est diminuée chez ce groupe de femme.

L'analyse par immunohistochimie des MMP-1, -2, -3, -7 et -9 nous a permis, d'une part, d'évaluer succinctement l'abondance protéique de la MMP cible, et d'autre part de déterminer sa localisation cellulaire.

Les données des immunomarquages ont confirmé les résultats obtenus en RT-PCR. En effet, l'expression protéique des différentes MMPs est augmentée dans différents types cellulaires (stromal, épithélial et leucocytaire) en fonction de la MMP étudiée, et dans les biopsies endométriales après imprégnation au progestatif. La comparaison par le test Chi-carré montre effectivement que toutes les MMPs sont significativement plus exprimées dans le groupe LNG court terme par rapport au groupe contrôle. Cependant, la comparaison des biopsies du groupe LNG long terme aux biopsies contrôles montre que seules les MMP-2, -7 et -9 sont statistiquement plus abondantes dans les biopsies sous Levonorgestrel.

La MMP-26, dont l'expression en ARNm est diminuée sous l'effet du progestatif, présente le même profil d'expression protéique. Elle est en effet significativement diminuée dans les deux groupes de biopsies LNG court et long termes. Son expression après exposition au Levonorgestrel est exclusivement déciduale.

Les activités gélatinolytiques de nos échantillons ont également été étudiées par zymographie sur gel de gélatine. Cette analyse montre que la forme active de la MMP-9 est présente dans 42% des biopsies endométriales du groupe LNG court terme et dans uniquement 9% des biopsies du groupe contrôle. Contrairement à la MMP-9, la forme active de la MMP-2 est présente dans 100% des biopsies des patientes exposées à court terme, dans 58% des biopsies exposées à long terme, et seulement dans 18% des biopsies du groupe contrôle.

2.2.2 Augmentation du nombre des macrophages sous l'effet du progestatif

La source principale de la MMP-12 est les macrophages. Afin de déterminer la corrélation entre le taux d'ARNm de cette métalloprotéase et l'infiltration du tissu endométrial par les macrophages, ces derniers ont été identifiés par un marquage anti-CD68.

Les résultats de l'immunohistochimie montrent que la densité cellulaire des macrophages est fortement augmentée dans les groupes sous LNG, par rapport au groupe des femmes en phase sécrétoire. La quantification du nombre de macrophages/mm² confirme l'analyse morphologique.

Conclusions

Dans cette étude, nous nous sommes focalisés sur l'analyse de l'expression des MMPs chez les femmes exposées à une courte et une longue période à un dispositif intra-utérin à libération hormonale. Notre attention s'est particulièrement portée sur les MMPs dont l'expression est augmentée durant les menstruations (Goffin *et al*, 2003).

L'analyse de l'expression des MMP-1, -2, -3, -7, -9 et -12 montre que celles-ci sont significativement augmentées sous l'effet du progestatif, en comparaison à ce qui est observé au sein des biopsies d'endomètres de femmes en cycle spontané. Par contre, l'expression de la MMP-26 diminue fortement après utilisation d'un SIU-LNG. Ces résultats montrent que le progestatif induit une modulation soit positive, soit négative de l'expression des MMPs.

En résumé, nous avons montré que l'expression des MMPs est augmentée à un degré qui dépend de la durée d'exposition au progestatif. Les premiers mois d'exposition caractérisés par des saignements fréquents, sont accompagnés d'une expression de la MMP-1, -2, -3, -7, -9. Cependant, une imprégnation à plus long terme, caractérisée par une réduction de ces saignements est associée à la diminution significative du pourcentage de femmes sous SIU-LNG exprimant les MMP-1 et -3, de même qu'une réduction du pourcentage des femmes exprimant les MMP-2, -7 et -9.

La diminution des spotting associés à l'utilisation d'un SIU-LNG pourrait ainsi être expliquée par le changement du profil d'expression de ces MMPs.

Differential elevation of matrix metalloproteinase expression in women exposed to levonorgestrel-releasing intrauterine system for a short or prolonged period of time

Soraya Labied¹, Christine Galant², Michelle Nisolle^{1,3}, Stéphanie Ravet¹, Carine Munaut¹, Etienne Marbaix², Jean-Michel Foidart^{1,3,4} and Francis Franken¹

¹Groupe Interdisciplinaire de Génomprotéomique Appliquée (GIGA-R), Laboratory of Tumor and Development Biology, Centre de Recherche en Cancérologie Expérimentale (CRCE), University of Liège, Tour de Pathologie (B23), Sart-Tilman, B-4000 Liège, Belgium; ²Department of Pathology and Cell Biology Unit, Université catholique de Louvain, Bruxelles, Belgium; ³Department of Gynecology, University of Liège, B-4000 Liège, Belgium

⁴Correspondence address. Tel: +32-4-366-25-68; Fax: +32-4-366-29-36; E-mail: jmfoiard@ulg.ac.be

BACKGROUND: The levonorgestrel-releasing intrauterine system (LNG-IUS) is an effective contraceptive and has many non-contraceptive health benefits. However, it is commonly associated with irregular endometrial bleeding. Metalloproteinases contribute to extracellular matrix (ECM) remodelling and regulate bleeding during the menstrual cycle. Enhanced metalloproteinase expression participates in the pathogenesis of breakthrough bleeding. Thus the objective of this study was to compare matrix metalloproteinase (MMP) expression in endometrium during luteal phase and in short-term (1 month) and long-term (≥ 6 months) LNG-IUS users. **METHODS:** MMP expression was analysed by semi-quantitative RT-PCR and immunohistochemistry. Gelatinase activity was determined by gelatin zymography. **RESULTS:** MMP-1, -2, -3, -7, -9 and -12 mRNAs levels were increased, whereas that of MMP-26 was decreased in the endometrium of LNG-IUS users. MMP-1, -2, -3, -7 and -9 were localized by immunohistochemistry in all biopsies in the short-term group but in only 0–27% in the control group. The incidence of positive immunostaining for MMP-2 and -3 decreased significantly in the long-term compared with short-term LNG-IUS users. MMP-26 was localized in all biopsies from the control group but in only 14 and 25% from the short- and long-term LNG-IUS groups, respectively. In both LNG groups, the numbers of macrophages (the major source of MMP-12) was increased. **CONCLUSIONS:** MMP-1, active MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 and MMP-12 are more prevalent in the short-term LNG-IUS group, suggesting their important contribution to ECM breakdown and transient bleeding. The decrease in the percentage of women expressing MMP-2 and -3 might contribute to the decreased occurrence of unwanted spotting and bleeding in long-term LNG-IUS users.

Keywords: levonorgestrel-IUS; matrix metalloproteinases; endometrial bleeding; contraceptive

Introduction

The progestogen-only contraception methods are used by a considerable number of women. The 20 $\mu\text{g}/\text{day}$ levonorgestrel-releasing intrauterine system (LNG-IUS) is associated with irregular and abnormal endometrial bleeding which constitutes one of the most common reasons for discontinuation of their use. Spotting and breakthrough bleeding are more frequently documented during the first few months of treatment. A multitude of factors have been proposed to contribute to this disorder but the exact mechanism leading to the bleeding episodes remains to be elucidated.

Among these factors, the tissue factor, the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and angiogenic factors have been reported (Critchley *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1999;

Lockwood *et al.*, 2000; Laoag-Fernandez *et al.*, 2003; Roopa *et al.*, 2003; Mints *et al.*, 2005). In addition, progesterone receptor and estrogen receptor expressions are dramatically reduced in endometrial epithelial and stromal cells of LNG-IUS users (Zhu *et al.*, 1999; Jones and Critchley, 2000; Galant *et al.*, 2004; Vereide *et al.*, 2006). An important modification in endometrial microvascular density and decrease in vessel maturation due to a lack of surrounding pericytes/smooth muscle cells is probably involved in this bleeding process along with modifications of endothelial basement membrane structure and composition (Rogers *et al.*, 1993; Hickey *et al.*, 1999; Jondet *et al.*, 2005; Stephanie *et al.*, 2007).

The matrix metalloproteinases (MMPs) represent one of the main candidates that play a critical role in these bleeding

disorders (Skinner *et al.*, 1999; Vincent *et al.*, 1999; Galant *et al.*, 2000; Chegini *et al.*, 2003; Galant *et al.*, 2004). In endometrium, MMPs are involved in matrix remodelling associated with the perimenstrual phase (Kokorine *et al.*, 1996; Marbaix *et al.*, 1996; Salamonsen *et al.*, 2002). Synthesized as inactive zymogens, they are either secreted or expressed as transmembrane proteins, they are inhibited by tissue inhibitors of MMPs and they can hydrolyse extracellular matrix (ECM) and non-ECM proteins (such as adhesion molecules, growth factors and cytokines). The MMP family is divided into four enzyme groups: collagenases, stromelysins, gelatinases and membrane-bound types, with a broad range of ECM substrates (Woessner, 1994; Nagase and Woessner, 1999). MMPs are differentially expressed during the various phases of the menstrual cycle. The expression of MMP-1 (collagenase-1), MMP-2 (gelatinase A), MMP-3 (stromelysin-1), MMP-7 (matrilysin-1), MMP-9 (gelatinase B) and MMP-12 (metalloelastase) is increased during menstruation in contrast to MMP-26 (matrilysin-2), which is expressed more during the proliferative phase (Goffin *et al.*, 2003). Previous results have shown that MMP-9 is up-regulated in stromal and epithelial cells following the administration of LNG-IUS (Skinner *et al.*, 1999). Inflammatory cells could also play a role in irregular bleeding in LNG-IUS and Norplant users by secreting an increased level of MMP-1 and MMP-9 (Vincent *et al.*, 1999; Milne *et al.*, 2001).

This study was aimed at assessing the expression of MMPs (specifically MMP-1, -2, -3, -7, -9, -12 and -26), most of which are up-regulated during normal menstruation, in endometrial biopsies from women with an LNG-IUS for 1 month or for 6 months to 5 years.

Materials and methods

Patients

The study was approved by the Ethical Committee of Liège University Hospital. There were 37 endometrial biopsies analysed. Patients treated with LNG-IUS for 1 month or for 6 months or more are referred to as 'short-term' and 'long-term' treated patients, respectively. Of the biopsies, 14 were obtained from women exposed to LNG-IUS (Mirena®, Bayer Schering Pharma, Berlin, Germany) for a period of 1 month. For this purpose, seven women (mean age 40.5 ± 4.6 years) with an indication of hysterectomy for repetitive episodes of menorrhagia were prospectively recruited. Written informed consent was obtained. These patients underwent an office hysteroscopy between days 21 and 25 of a spontaneous cycle without a bleeding episode, in order to establish the aetiology of the intermittent menorrhagia and to exclude malignancy. In all cases, the uterine cavity was found to be covered by endometrium without polyps myoma or malignancy. An endometrial biopsy was simultaneously performed with a Cornier Pipelle suction curette (baseline biopsy), and ovulation was documented by plasma determination of progesterone above 6 ng/ml. A second biopsy was taken at the time of hysterectomy. LNG-IUS was inserted for a median period of 1 month prior to surgery during which all women experienced one or several spotting/bleeding episodes for a total of 15–21 days duration (short-term LNG group).

Twelve biopsies were obtained from women (mean age 40.1 ± 6.7 years) exposed to LNG-IUS for a long period [mean duration of exposure 33 months (range 6–60 months)]. In three women, an

office hysteroscopy was performed for transient bleeding that had occurred more than 40 days before endometrial sampling. The endometrium was found to be atrophic with no intrauterine pathology. In nine other cases, endometrial biopsies were performed at the time of LNG-IUS withdrawal for fertility desire or LNG-IUS change (long-term LNG group). In both LNG groups, the absence of intrauterine organic lesions was thus documented.

The control group consisted of 11 endometrial biopsies, performed during the mid-secretory phase of a spontaneous documented ovulatory cycle of healthy women with documented fertility (mean age 33.1 ± 3.1 years). This control group allowed an adequate comparison between LNG-IUS users and control women with 'normal endometrium', spontaneous ovulatory cycles and documented fertility. This group is more appropriate than an age-matched control group. It indeed allows the comparison of the impact of LNG on endometrial histology with that of spontaneous ovulatory cycles during the luteal phase with optimal exposure to endogenous progesterone. On the contrary, the use of age-matched controls might have resulted in ovulatory cycles with inadequate progesterone secretion in this age group. This would have resulted in an inappropriate endometrial histology with a deficient secretory phase (Fox, 1995b). It is indeed well documented that LNG-IUS has a major impact on endometrium histology while the effect of age is minimal in women who have documented ovulatory cycles with adequate progesterone exposure.

Endometrial tissues

All biopsies were obtained with a Cornier Pipelle suction curette (CCD International, Paris, France) that allows the sampling of the functional layer of the endometrium. The first part of tissue was fixed in 4% formaldehyde solution in phosphate-buffered saline and embedded in paraffin for immunohistochemistry. The second part of biopsy was snap-frozen for RNA and protein extraction. Specimens obtained during the mid-secretory phase were classified according to classical histological criteria (Noyes *et al.*, 1950).

RNA and protein extraction

Total RNA was extracted with an RNeasy kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands), according to the manufacturer's protocol. RNA concentration was determined with an ND-1000 NanoDrop spectrophotometer (Isogen Life Science, IJssenstein, The Netherlands). For protein extraction, samples were lysed in RIPA lysis buffer [50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 1% Triton X-100, 1% Na-deoxycholate, 0.1% SDS; supplemented with Complete Mini protease inhibitor cocktail (Roche/Boehringer, Mannheim, Germany)]. The total protein concentrations of specimens were determined with a Bio-Rad Dc Protein Assay (BioRad, Hercules, CA, USA).

RT-PCR amplification

28S ribosomal RNA (rRNA) and MMP mRNAs were measured in 10 ng aliquots of total RNA by RT-PCR which was performed using the GeneAmp ThermoStable rTth reverse transcriptase RNA PCR kit (Perkin-Elmer, Branchburg, NJ, USA) and specific pairs of primers (5 pmol each; Eurogentec, Seraing, Belgium) as described previously (Goffin *et al.*, 2003). RT-PCR products were resolved on 10% polyacrylamide gels and analysed using a Fluor-S MultiImage (BioRad) after staining with Gelstar dye (FMC BioProduct, Rockland, ME, USA). MMP products were quantified by normalization with respect to 28S rRNA. RT-PCR was performed in duplicate for each sample. The two experiments, with 3–15% differences, were normalized.

Zymography

Gelatinolytic activities were assessed by gelatinase zymography. First, 20 µg of tissue-extracted proteins were applied to 10% SDS-polyacrylamide gels containing 1 mg/ml gelatin (Sigma, St Louis, MO, USA). After electrophoresis, SDS was removed from the gels by two incubations in 2% Triton X-100 for 30 min. The gels were incubated overnight at 37°C in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.2M NaCl, 5 mM CaCl₂ and 1 µM ZnCl₂. The gels were then stained for 20 min with Coomassie Blue and destained for 2 h. Proteolytic activities were evidenced as clear bands against the blue background of stained gelatin.

Immunohistochemistry

Serial sections (5-µm thick) were stained with haematoxylin and eosin or used for immunohistochemical localization of MMP-1, -2, -3, -7, -9 and CD68 specific of macrophage with mouse monoclonal antibodies (Table I). A rabbit anti-human antibody was used to stain MMP-26. Paraffin sections were first incubated for 30 min at room temperature with 3% H₂O₂ in order to block the endogenous peroxidases and then boiled in 10 nmol/L citrate buffer, pH 5.7, using a microwave oven. Sections were incubated overnight at 4°C with diluted primary antibodies, and specific binding was revealed using either Envision or an appropriate secondary Ab according to Table I. Staining was visualized using diaminobenzidine as chromogen.

In each run, a positive menstrual endometrium was used and negative controls were performed by replacement of the primary antibody with a non-relevant antibody of the same isotype (IG2a against proinsulin; IgG1 against adrenocorticotrophic hormone).

Two principal cell types were detected and analysed by immunostaining for MMPs: stromal cells and decidual cells. Regarding the stromal cells, there were no variations in staining intensity. Semi-quantification was made on the basis of the number of positive cells, and at least a cluster of stromal cells was present to consider the case as positive. Decidual cells were diffusely stained, but the intensity could vary. For MMP-7 and -26, epithelial staining was also present, diffuse and intense without significant variations. Polynuclear neutrophils were stained strongly with the MMP-9 antibody. All the slides were analysed by two blinded observers.

Macrophage quantification

Slides were observed at ×100 magnification with an Olympus microscope (Omnilabo, Aartselaar, Belgium). Five different microscopic fields of each section were analysed and macrophage numbers were determined per square millimetre using Image J 1.37v software

developed by Wayne Rasband (National Institutes of Health, Bethesda, ML, USA).

Statistical analysis

Analysis for statistical significance was evaluated with non-parametric methods. Kruskal-Wallis with Dunn's correction for multiple comparisons was applied for RT-PCR analysis. Immunostaining comparison between groups was performed using the χ^2 test with Fisher's exact correction. Statistical significance was set at $P \leq 0.05$.

Results

Effect of LNG-IUS on MMP mRNA expression

The mRNA expression of several MMPs has been assessed in the endometrium from short- and long-term users, as well as from control women and baseline cycles sampled during the mid-secretory phase. Control and baseline groups showed identical patterns of MMP expression (data not shown). When compared with control women, a significantly higher level of mRNAs in MMP-1, -2, -3, -7, -9 and -12 was observed in short-term and in long-term LNG-IUS users (Fig. 1A-F). MMP-26 presented an inverse mRNA expression pattern, since its expression was lower in the endometrium of long-term LNG-IUS users (Fig. 1G).

Effect of LNG-IUS on MMP-1, -3, -7 and -26 protein expressions

Exposure to LNG produced a variable picture in the endometrium, particularly in the short-term treatment group, as classically observed (Fox, 1995a). Representative illustrations are shown in Fig. 2. Most commonly, the endometrium is shallow, with somewhat limited proliferative activity and only very occasional evidence of mitosis, with few glands, variable decidualization and infiltration of macrophages plus occasional lymphocytes.

MMP-1 expression by stromal and decidual cells (Fig. 2A, B and C) was seen in all biopsies from the short-term LNG group (100%), in 66% of long-term-treated women and in 27–28% of the control or baseline groups (Table II). MMP3 was expressed by stromal cells (Fig. 2G, H and I) in 100% of the short-term LNG group, 41% in the long-term biopsies and 14–18% in the control or baseline group (Table II). MMP-1 and -3 were expressed in significantly more biopsies of the short-term

Table I. Primary and secondary antibodies used for immunohistochemistry.

	Primary Ab	Secondary Ab
MMP-1	0.2 µg/ml (provided by K. Iwata, Fuji Chemical Industries, Ltd, Toyama, Japan)	Envision system labelled HRP anti-mouse (K4001, DakoCytomation, Glostrup, Denmark), for 75 min at room temperature
MMP-2	2 µg/ml (provided by K. Iwata)	Envision system labelled HRP anti-mouse, for 75 min at room temperature
MMP-3	1 µg/ml (MAB3306, R&D System, Minneapolis, MN, USA)	Envision system labelled HRP anti-mouse, for 75 min at room temperature
MMP-7	1 µg/ml (IM40L, Calbiochem, Darmstadt, Germany)	Envision system labelled HRP anti-mouse, for 75 min at room temperature
MMP-9	0.5 µg/ml (IM37L, Calbiochem)	Envision system labelled HRP anti-mouse, for 75 min at room temperature
MMP-26	1.5 µg/ml (gift from A. Sang, Florida State University)	Swine anti-rabbit (P0217, DakoCytomation) diluted 1/100 for 30 min, at room temperature
CD68	Ready to use (M0876, DakoCytomation)	Goat anti-mouse Ab conjugated to biotin (E433, DakoCytomation), diluted 1/400 for 30 min at room temperature

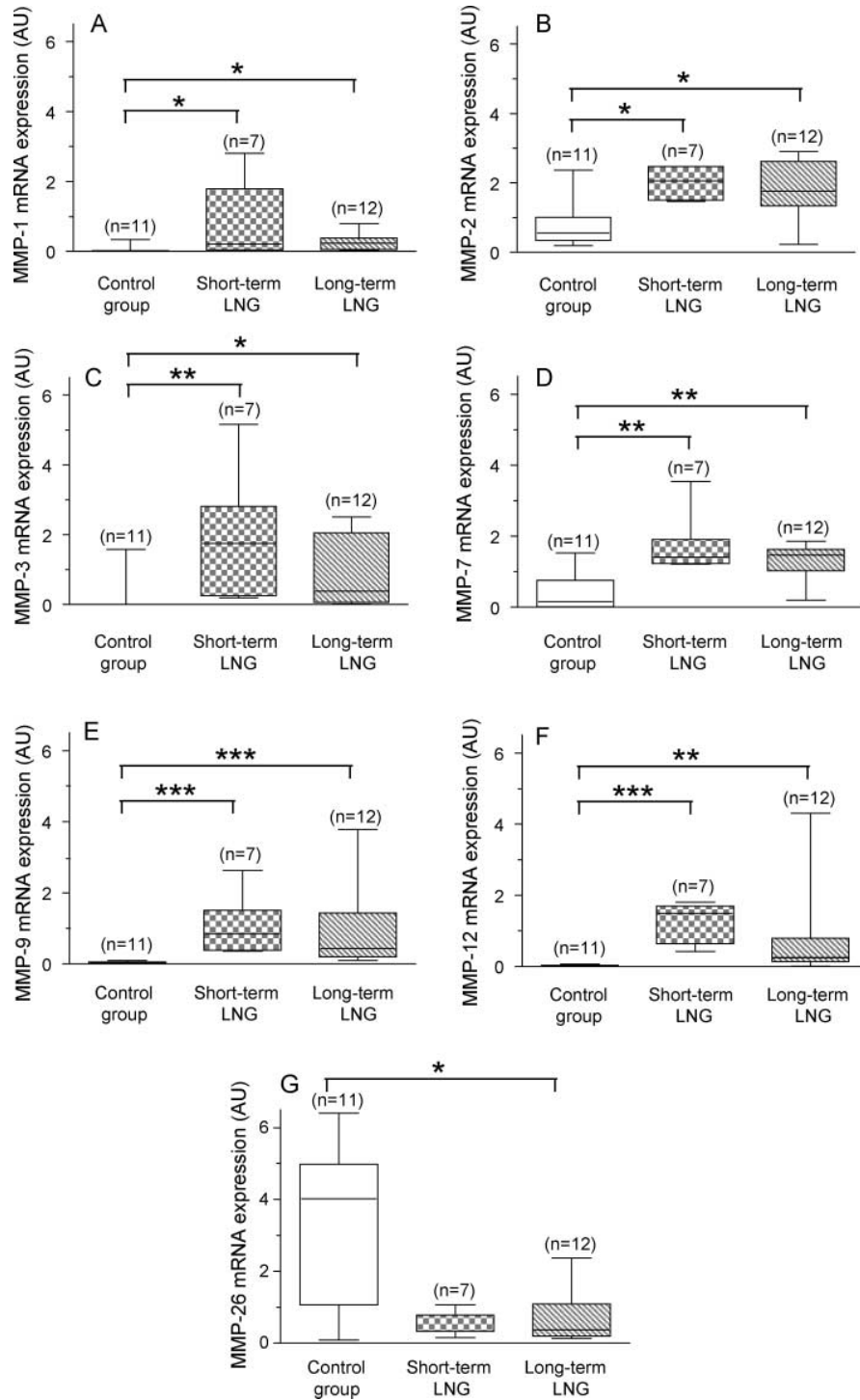


Figure 1: Quantification of mRNA level by semi-quantitative RT-PCR. mRNA expression (mean ± SEM) of biopsies in control ($n = 11$), short-term LNG ($n = 7$) and long-term ($n = 12$) LNG groups. mRNA expression of MMP-1 (NbC = 30) (A), MMP-2 (NbC = 24) (B), MMP-3 (NbC = 30) (C), MMP-7 (NbC = 30) (D), MMP-9 (NbC = 30) (E), MMP-12 (NbC = 32) (F) and MMP-26 (NbC = 29) (G). The results are expressed in arbitrary units, corresponding to a ratio between the number of mRNA copies and 28S rRNA for each sample (* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.001$; *** $P \leq 0.0001$). NbC, number of cycles.

LNG group than of the control or baseline groups ($P \leq 0.003$), whereas there was no significant difference between the long-term LNG and the control groups.

In control and baseline samples (data not shown), MMP-7 was weakly stained in surface and glandular epithelial cells

(Fig. 2J, K and L; data not shown). Significantly, more short-term (100%) and long-term (75%) biopsies displayed a strong MMP-7 staining compared with control or baseline biopsies (27–28%) ($P \leq 0.02$) (Table II). In contrast, an important immunostaining of MMP-26 by epithelial cells was

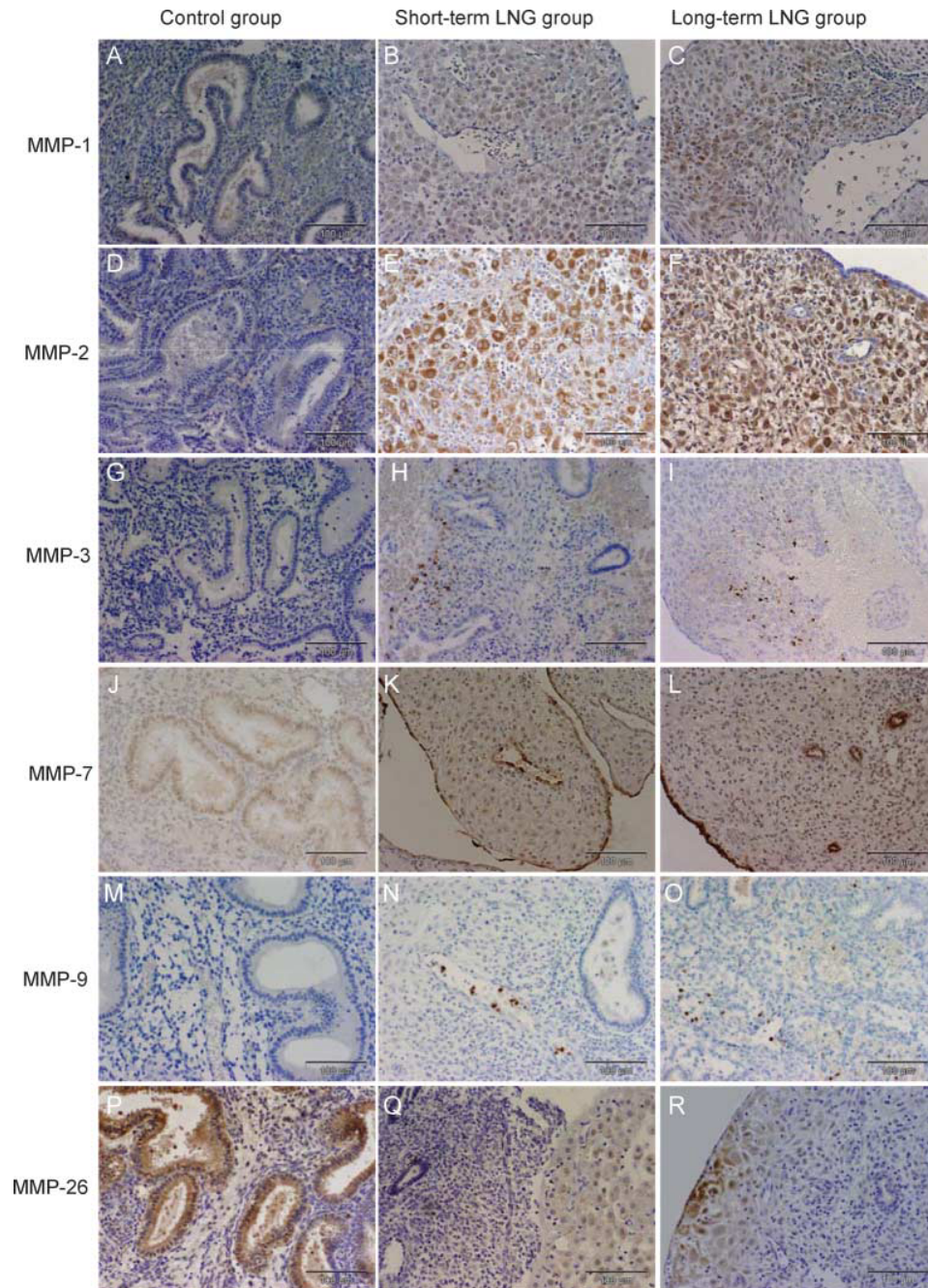


Figure 2: Immunohistochemistry of MMPs. Representative negative immunostaining of MMPs in a mid-secretory phase (control group) ($n = 11$) (A, D, G, J and M) and positive immunostaining in a short-term LNG ($n = 7$) (B, E, H, K and N) and a long-term LNG ($n = 12$) (C, F, I, L and O) biopsy. Opposite immunostaining was observed for MMP-26 (P, Q and R). Scale bar: 100 μm .

Table II. Incidence of positive immunostaining of MMP-1, -2, -3, -7, -9 and MMP-26 in the control, baseline, short-term and long-term LNG groups.

	Control group ($n = 11$)	Baseline group ($n = 7$)	Short-term LNG group ($n = 7$)	Long-term LNG group ($n = 12$)
MMP-1	3 (27%)	2 (28%)	7 (100%)**	8 (66%)
MMP-2	1 (9%)	1 (14%)	7 (100%***)	6 (50%)* [†]
MMP-3	2 (18%)	1 (14%)	7 (100%)**	5 (41%) [†]
MMP-7	3 (27%)	2 (28%)	7 (100%)**	9 (75%)*
MMP-9	0 (0%)	0 (0%)	7 (100%***)	8 (66%)**
MMP-26	11 (100%)	7 (100%)	1 (14%***)	3 (25%***)

*Compared with control group or with baseline group; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.001$; *** $P \leq 0.0001$.

[†]Compared with short-term group LNG, [†] $P \leq 0.05$.

seen in all samples of control and baseline groups (Fig. 2P). After LNG-IUS use, staining was absent in epithelial cells, whereas decidual cells showed a faint staining in only 14 and 25% of short-term and long-term groups, respectively (Table II and Fig. 2Q and R).

Effect of LNG-IUS on MMP-2 and -9 protein expressions and activation

As assessed by immunohistochemistry, MMP-2 in stromal and decidual cells was seen in a significantly higher proportion of biopsies from LNG-treated groups than from control and baseline groups ($P \leq 0.04$) (Table II, Fig. 2D, E and F). MMP-2 was immunodetected in all short-term-treated women ($n = 7$), but in only one-half of the long-term subjects ($n = 12$) (Table II).

MMP-9 immunostaining was specifically seen in polymorphonuclear inflammatory cells apposed to the endothelial cell lining of vessels in LNG-treated patients but not in control women. Here again, MMP-9 was detected in all short-term subjects (100%) and only in two-thirds (66%) of the long-term-treated women (Fig. 2M, N and O).

Zymography revealed that active forms of MMP-9 were present in the endometrium of 1/11 (9%) biopsies of control group, in no biopsy of the baseline group (data not shown) and in 3/7 (42%) of short-term subjects. Importantly, activated forms of MMP-2 were seen in all samples (100%) of short-term LNG users, in 7/11 (63%) biopsies of long-term LNG group and in only 2/11 (18%) and 0/7 biopsies of control and baseline groups (Fig. 3).

Effect of LNG-IUS on the number of macrophages in endometrium

Qualitative (Fig. 4A, B and C) and quantitative (Fig. 4D) analysis of CD68 immunostaining showed a significantly higher number of macrophages in the short-term ($P \leq 0.001$) and long-term LNG ($P \leq 0.0001$) groups when compared with the control group. No difference was observed between the LNG groups.

Discussion

LNG-IUS is an intrauterine contraceptive system also licensed for the treatment of menorrhagia. The intrauterine exposure of the endometrium to locally elevated levels of LNG results in marked endometrial atrophy and variable stromal cells decidualization, confirmed by insulin-like growth factor-binding

protein 1 staining (data not shown), particularly in the long-term treatment group. As documented previously, this treatment causes a variability of appearance of the endometrium particularly after short-term treatment (Fig. 2) (Fox, 1995a). This has been ascribed to several factors. First, ovulation is not consistently inhibited in these women. Second, bleeding that occurs somewhat erratically is followed by a healing rather than a true proliferative phase. Third, the degree of decidualization may vary between samples, and area in the same endometrium. Our findings are thus in accordance with previous studies (Silverberg *et al.*, 1986; Critchley *et al.*, 1998; Guttinger and Critchley, 2007).

Uterine bleeding at menstruation results from MMP-mediated degradation of the ECM and basement membranes (Marbaix *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1998; Dong *et al.*, 2002; Salamonsen *et al.*, 2002; Zhang and Salamonsen, 2002; Goffin *et al.*, 2003; Salamonsen, 2003; Jabbour *et al.*, 2006). However, the role of these proteinases in the mechanisms responsible for abnormal uterine bleeding associated with LNG-IUS has not been thoroughly assessed.

MMPs are widely recognized as key regulators of ECM turnover. MMP-1 cleaves fibrillar collagens including collagen types I and III, which are major components of endometrial interstitial ECM, thereby initiating ECM breakdown. In addition, by cleaving collagen type IV, laminin and elastin, the major components of the subendothelial basement membrane, MMP-2, -3, -7, -9 and -12 represent important potential effectors for vascular rupture. In parallel, MMP-3 is an important enzyme, as it plays a central role in establishing a cascade of MMPs activation (Salamonsen and Woolley, 1996). In this study, we compared the expression of MMPs in the endometrium of normal women with spontaneous ovulatory cycles during the luteal phase or during LNG treatment, with a particular emphasis on those MMPs that are specifically up-regulated at the time of normal menstrual bleeding (Goffin *et al.*, 2003).

Endometrial mRNA levels of MMP-1, -2, -3, -7, -9 and -12 were significantly increased in the short- and long-term LNG groups when compared with LNG-untreated samples, whereas MMP-26 expression was down-regulated by treatment with LNG. Specific immunostaining for MMPs confirmed this differential pattern of expression.

A significantly higher proportion of short-term LNG-IUS users showed immunostaining for MMP-1, -2, -3, -7, -9, whereas only MMP-2, -7 and -9 remained elevated in the

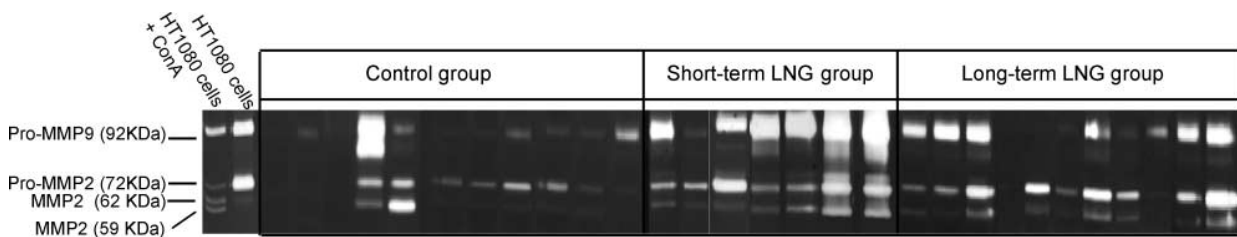


Figure 3: Gelatin zymography. MMP-2 and -9 expressions in endometrial tissue extract in control ($n = 11$), short-term LNG ($n = 7$) and long-term LNG ($n = 11$, one protein extract was lost) groups. Gelatinase activity appears as bands of gelatin clearing. Medium conditioned by HT-1080 cells in the presence or absence of Concanavallin A (ConA) was used as a control, containing the latent 92-kDa pro-MMP-9, the latent 72-kDa pro-MMP-2 and its 62- and 59-kDa-activated forms.

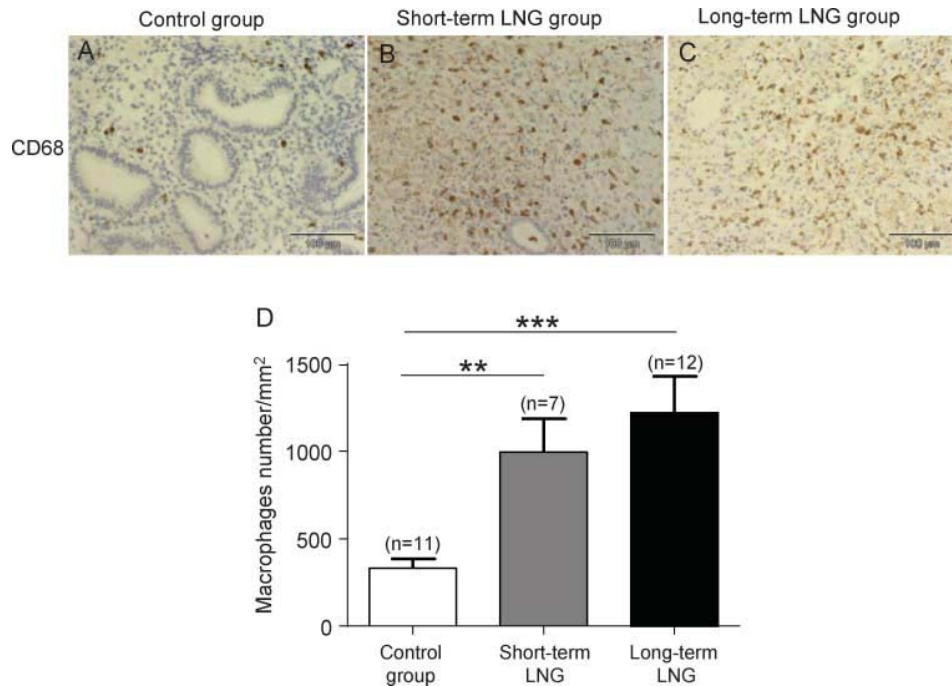


Figure 4: Macrophage staining and quantification. Macrophage staining using CD68 Ab in control (A) ($n = 11$), short-term LNG (B) ($n = 7$) and long-term LNG (C) ($n = 12$) groups. Macrophage number/mm² (D) in the control and LNG groups (** $P \leq 0.001$, *** $P \leq 0.0001$). Scale bar: 100 μm .

long-term LNG group when compared with the control and baseline groups.

MMP-1 was localized in the decidual cells of both LNG user groups in this study and in the stromal cells of Norplant users (subcutaneous LNG) (Vincent *et al.*, 2000). It was also increased in LNG-IUS users experiencing irregular bleeding (Milne *et al.*, 2001). In these studies, MMP-1 immunostaining was distributed in decidual/stromal cells throughout endometrium but was not confined to specific areas of tissue breakdown. On the contrary, Galant *et al.* (2000) demonstrated by *in situ* hybridization that MMP-1 mRNA was synthesized in foci of stromal breakdown in the endometrium of women using Norplant.

MMP3 mRNA and protein expressed by stromal cells were also increased in both LNG user groups. This MMP3 was shown to be particularly more prominent in the bleeding group than in the amenorrhoea group (Oliveira-Ribeiro *et al.*, 2004). A similarly elevated expression of MMP-3 was documented in Norplant users and in menstrual controls (Marbaix *et al.*, 2000; Vincent *et al.*, 2000). Collectively these data and our demonstration of an increased focal expression of MMP-1 and -3 by stromal cells after a short period of LNG-IUS use suggest that increased MMP-1 and -3 expressions may be associated with bleeding that occurs frequently in short-term LNG users.

Endometrial expression of MMP-7 is poorly defined with a reported decreased expression during the secretory phase (Graesslin *et al.*, 2006) and an increase during menstruation (Goffin *et al.*, 2003). In this study, we found that MMP-7 mRNA level and protein localization in glandular and surface epithelial cells were enhanced in LNG-exposed women both for short and long periods.

MMP-2 and -9 expressions were documented by RT-PCR and immunohistochemistry. Their activity was assessed by gelatin zymography. Previous studies have localized MMP-9 in endometrial glandular and stromal cells and endothelial cells of women with an LNG-IUS (Skinner *et al.*, 1999). In contrast, in our study, MMP-9 expression was confined to polymorphonuclear inflammatory cells, specifically neutrophils identified by CD15 immunostaining (data not shown). These cells are normally present only between days 26 and 28 of the menstrual cycle, when plasma steroids levels decrease (Salamonsen *et al.*, 2002).

The absence of neutrophils from the endometrium in the control group and in the baseline group may explain the lack of MMP-2 and -9 expressions in these women. Other studies also found that MMP-9-positive cells, neutrophils and eosinophils were abundant in endometrial biopsies from Norplant or LNG-IUS users or control menstrual biopsies (Gu *et al.*, 1995; Vincent *et al.*, 1999; Salamonsen, 2003).

In our study, (pro)-MMP-2 expression was significantly increased in decidual cells of short- and long-term LNG groups. Interestingly, as demonstrated by gelatin zymography, active MMP-2 was present in a higher proportion of women exposed to LNG-IUS.

MMP-12 expression has also been described predominantly in the perimenstrual period, suggesting a role in tissue breakdown (Goffin *et al.*, 2003; Pilka *et al.*, 2004). By a semi-quantitative RT-PCR analysis, we demonstrate here that MMP-12 mRNA level increased significantly in short- and long-term LNG biopsies. Macrophages represent in most tissues its major source (Shapiro *et al.*, 1993). In our study, these CD68-positive cell numbers were associated with the

elevated MMP-12 mRNA expression, as also suggested by Critchley *et al.* (1998). However the lack of monoclonal antibody specific to MMP12 precluded its immunolocalization in CD68-positive cells.

MMP-26 presented an expression profile inverse to that of other studied MMPs. Both the MMP-26 transcript and protein decreased in the two LNG groups when compared with control biopsies.

It is well known that irregular bleeding is more abundant during the first 6 months after LNG treatment and then decreases with time. In our study, we demonstrate that MMP-1, active MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 and MMP-12 are more prevalent in the short-term LNG group, suggesting their important contribution to ECM breakdown and bleeding during first treatment months. The incidence of positive immunostaining showed a significant decrease (MMP-2 and -3) or non-significant trend of reduction (MMP-1, -7 and -9) (Table II) in the long-term LNG-IUS group. It might therefore be suggested that the decreased occurrence of unwanted spotting and bleeding associated with the LNG-IUS use is related to this change of MMP profiling.

In conclusion, LNG-IUS causes complex remodelling of the endometrium, with stromal cells decidualization, infiltration by neutrophils and macrophages and increased expression of a variety of MMPs in a pattern that modifies over time. The MMPs that are up-regulated at the time of menstruation and bleeding are identified in endometrial cells of women treated with LNG, more prominently during the first month of exposure. Such an increased expression may therefore be associated with the increased incidence of unwanted spotting and bleeding frequently encountered in these women. Locally delivered broad spectrum MMP inhibitors might eventually be useful to prevent such side effects.

Funding

This work was supported by grants from the Communauté française de Belgique (Actions de Recherches Concertées), the Commission of European Communities, NOE No. LSHM-CT-2004-512040 'EMBIC', the Fonds de la Recherche Scientifique Médicale, the Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS, Belgium), the Fonds spéciaux de la Recherche (University of Liège), the Fondation Léon Fredericq (University of Liège), the DGTRE from the 'Région Wallonne', the program NEOANGIO No. 616476-Programme d'excellence 'Marshall', the FSE (Fonds Social Européen), the Fonds d'Investissements de la Recherche Scientifique (FIRS, CHU, Liège, Belgium), the Interuniversity Attraction Poles Programme—Belgian Science Policy (Brussels, Belgium).

Acknowledgements

The authors thank Pr Amy Sang Qing-Xing for providing antibodies for anti-MMP-26. Nathalie Lefin, Erica Konradowski, Patricia Gavittelli, Isabelle Dasoul, Emilie Feyereisen, Fabienne Perin and Laurence Poma are acknowledged for their excellent technical assistance.

References

- Chegini N, Rhoton-Vlasak A, Williams RS. Expression of matrix metalloproteinase-26 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-3 and -4 in endometrium throughout the normal menstrual cycle and alteration in users of levonorgestrel implants who experience irregular uterine bleeding. *Fertil Steril* 2003;**80**:564–570.
- Critchley HO, Wang H, Jones RL, Kelly RW, Drudy TA, Gebbie AE, Buckley CH, McNeilly AS, Glasier AF. Morphological and functional features of endometrial decidualization following long-term intrauterine levonorgestrel delivery. *Hum Reprod* 1998;**13**:1218–1224.
- Dong JC, Dong H, Campana A, Bischof P. Matrix metalloproteinases and their specific tissue inhibitors in menstruation. *Reproduction* 2002;**123**:621–631.
- Fox H. *Haines and Taylor Obstetrical and Gynaecological Pathology*. 1995a,1153–1154.
- Fox H. *Haines and Taylor Obstetrical and Gynaecological Pathology*. 1995b, 365–382.
- Galant C, Vekemans M, Lemoine P, Kokorine I, Twagirayezu P, Henriot P, Picquet C, Rigot V, Eeckhout Y, Courtoy PJ *et al.* Temporal and spatial association of matrix metalloproteinases with focal endometrial breakdown and bleeding upon progestin-only contraception. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;**85**:4827–4834.
- Galant C, Berliere M, Dubois D, Verougstraete JC, Charles A, Lemoine P, Kokorine I, Eeckhout Y, Courtoy PJ, Marbaix E. Focal expression and final activity of matrix metalloproteinases may explain irregular dysfunctional endometrial bleeding. *Am J Pathol* 2004;**165**:83–94.
- Goffin F, Munaut C, Franckenne F, Perrier DS, Belliard A, Fridman V, Nervo P, Colige A, Foidart JM. Expression pattern of metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix-metalloproteinases in cycling human endometrium. *Biol Reprod* 2003;**69**:976–984.
- Graesslin O, Cortez A, Fauvet R, Lorenzato M, Birembaut P, Darai E. Metalloproteinase-2, -7 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 expression in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium: a clinical–pathological correlation study. *Ann Oncol* 2006;**17**:637–645.
- Gu Z, Zhu P, Luo H, Zhu X, Zhang G, Wu S. A morphometric study on the endometrial activity of women before and after one year with LNG-IUD in situ. *Contraception* 1995;**52**:57–61.
- Guttinger A, Critchley HO. Endometrial effects of intrauterine levonorgestrel. *Contraception* 2007;**75**:S93–S98.
- Hickey M, Simbar M, Markham R, Young L, Manconi F, Russell P, Fraser IS. Changes in vascular basement membrane in the endometrium of Norplant users. *Hum Reprod* 1999;**14**:716–721.
- Jabbour HN, Kelly RW, Fraser HM, Critchley HO. Endocrine regulation of menstruation. *Endocr Rev* 2006;**27**:17–46.
- Jondet M, Letellier B, Verdys MT. Endometrial vascularization in levonorgestrel intrauterine device users; computerized microvessel measurement study. *Contraception* 2005;**71**:60–64.
- Jones RL, Critchley HO. Morphological and functional changes in human endometrium following intrauterine levonorgestrel delivery. *Hum Reprod* 2000;**15**(Suppl. 3):162–172.
- Kokorine I, Marbaix E, Henriot P, Okada Y, Donnez J, Eeckhout Y, Courtoy PJ. Focal cellular origin and regulation of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) are related to menstrual breakdown in the human endometrium. *J Cell Sci* 1996;**109**:2151–2160.
- Laoag-Fernandez JB, Maruo T, Pakarinen P, Spitz IM, Johansson E. Effects of levonorgestrel-releasing intra-uterine system on the expression of vascular endothelial growth factor and adrenomedullin in the endometrium in adenomyosis. *Hum Reprod* 2003;**18**:694–699.
- Lockwood CJ, Runic R, Wan L, Krikun G, Demopolous R, Schatz F. The role of tissue factor in regulating endometrial haemostasis: implications for progestin-only contraception. *Hum Reprod* 2000;**15**(Suppl. 3):144–151.
- Marbaix E, Kokorine I, Moulin P, Donnez J, Eeckhout Y, Courtoy PJ. Menstrual breakdown of human endometrium can be mimicked in vitro and is selectively and reversibly blocked by inhibitors of matrix metalloproteinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;**93**:9120–9125.
- Marbaix E, Vekemans M, Galant C, Rigot V, Lemoine P, Dubois D, Picquet C, Henriot P, Twagirayezu P, Sufi S *et al.* Circulating sex hormones and endometrial stromelysin-1 (matrix metalloproteinase-3) at the start of bleeding episodes in levonorgestrel-implant users. *Hum Reprod* 2000;**15**(Suppl. 3):120–134.
- Milne SA, Rakhyoot A, Drudy TA, Brechin S, Riley SC, Critchley HO. Co-localization of matrix metalloproteinase-1 and mast cell tryptase in the human uterus. *Mol Hum Reprod* 2001;**7**:559–565.
- Mints M, Blomgren B, Falconer C, Fianu-Jonasson A, Palmblad J. Microvascular density, vascular endothelial growth factor A, and its

- receptors in endometrial blood vessels in patients with menorrhagia. *Fertil Steril* 2005;**84**:692–700.
- Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;**274**:21491–21494.
- Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril* 1950;**1**:3–25.
- Oliveira-Ribeiro M, Petta CA, Angelo Andrade LA, Bahamondes L, Hidalgo MM. Correlation between endometrial histology, microvascular density and calibre, matrix metalloproteinase-3 and bleeding pattern in women using a levonorgestrel-releasing intrauterine system. *Hum Reprod* 2004;**19**:1778–1784.
- Pilka R, Kudela M, Hansson S, Casslen B. Novel matrix metalloproteinases in cycling endometrium. *Ceska Gynecol* 2004;**69**:262–266.
- Rogers PA, Au CL, Affandi B. Endometrial microvascular density during the normal menstrual cycle and following exposure to long-term levonorgestrel. *Hum Reprod* 1993;**8**:1396–1404.
- Roopa BA, Loganath A, Singh K. The effect of a levonorgestrel-releasing intrauterine system on angiogenic growth factors in the endometrium. *Hum Reprod* 2003;**18**:1809–1819.
- Salamonsen LA. Tissue injury and repair in the female human reproductive tract. *Reproduction* 2003;**125**:301–311.
- Salamonsen LA, Woolley DE. Matrix metalloproteinases in normal menstruation. *Hum Reprod* 1996;**11**(Suppl. 2):124–133.
- Salamonsen LA, Zhang J, Brasted M. Leukocyte networks and human endometrial remodelling. *J Reprod Immunol* 2002;**57**:95–108.
- Shapiro SD, Kobayashi DK, Ley TJ. Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. *J Biol Chem* 1993;**268**:23824–23829.
- Silverberg SG, Haukkamaa M, Arko H, Nilsson CG, Luukkainen T. Endometrial morphology during long-term use of levonorgestrel-releasing intrauterine devices. *Int J Gynecol Pathol* 1986;**5**:235–241.
- Skinner JL, Riley SC, Gebbie AE, Glasier AF, Critchley HO. Regulation of matrix metalloproteinase-9 in endometrium during the menstrual cycle and following administration of intrauterine levonorgestrel. *Hum Reprod* 1999;**14**:793.
- Stephanie R, Labied S, Blacher S, Francken F, Munaut C, Fridman V, Beliard A, Foidart JM, Nisolle M. Endometrial vessel maturation in women exposed to levonorgestrel-releasing intrauterine system for a short or prolonged period of time. *Hum Reprod* 2007;**22**:3084–3091.
- Vereide AB, Kaino T, Sager G, Arnes M, Orbo A. Effect of levonorgestrel IUD and oral medroxyprogesterone acetate on glandular and stromal progesterone receptors (PRA and PRB), and estrogen receptors (ER-alpha and ER-beta) in human endometrial hyperplasia. *Gynecol Oncol* 2006;**101**:214–223.
- Vincent AJ, Malakooti N, Zhang J, Rogers PA, Affandi B, Salamonsen LA. Endometrial breakdown in women using Norplant is associated with migratory cells expressing matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B). *Hum Reprod* 1999;**14**:807–815.
- Vincent AJ, Zhang J, Ostor A, Rogers PA, Affandi B, Kovacs G, Salamonsen LA. Matrix metalloproteinase-1 and -3 and mast cells are present in the endometrium of women using progestin-only contraceptives. *Hum Reprod* 2000;**15**:123–130.
- Woessner JF, Jr. The family of matrix metalloproteinases. *Ann NY Acad Sci* 1994;**732**:11–21.
- Zhang J, Salamonsen LA. In vivo evidence for active matrix metalloproteinases in human endometrium supports their role in tissue breakdown at menstruation. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;**87**:2346–2351.
- Zhang J, Nie G, Jian W, Woolley DE, Salamonsen LA. Mast cell regulation of human endometrial matrix metalloproteinases: a mechanism underlying menstruation. *Biol Reprod* 1998;**59**:693–703.
- Zhu P, Liu X, Luo H, Gu Z, Cheng J, Xu R, Lian S, Wu S, Wang J. The effect of a levonorgestrel-releasing intrauterine device on human endometrial oestrogen and progesterone receptors after one year of use. *Hum Reprod* 1999;**14**:970–975.

Submitted on April 28, 2008; resubmitted on July 17, 2008; accepted on August 11, 2008

V-Conclusions et discussion

Une vie reproductive avec des cycles ovulatoires réguliers ainsi qu'une grossesse sans complication représentent les deux grands souhaits de toute femme en âge de procréer. A ce jour, la pré-éclampsie, l'endométriose ainsi que les saignements intermenstruels restent des affections gynécologiques répandues durant la vie reproductive d'une femme. Plusieurs facteurs et mécanismes sont à l'origine de ces pathologies. Notre travail a mis en évidence qu'elles sont en partie orchestrées par des défaillances au niveau des systèmes protéolytiques, tels que le système plasminogène/plasmine et les métalloprotéases.

Le rôle du «plasminogen activator inhibitor-1» (PAI-1) ou SERPINE-2 ainsi que des métalloprotéases (MMPs) a largement été documenté dans divers phénomènes physiologiques tels que la reproduction, la cicatrisation et l'angiogenèse mais également pathologiques tels que la progression tumorale et l'angiogenèse qui lui est associée, et les maladies cardiovasculaires (Bajou *et al*, 1998; Lambert *et al*, 2001; Gutierrez *et al*, 2000). L'expression de PAI-1 est considérée comme un facteur de mauvais pronostic et est associée à une plus grande agressivité tumorale dans divers types de cancers, tels que les cancers du sein (Grondahl-Hansen *et al*, 1993) et du poumon (Pappot *et al*, 2006). Plusieurs équipes ont montré l'augmentation de l'expression de PAI-1 chez les femmes souffrant d'endométriose (Bruse *et al*, 1998; Bruse *et al*, 2004b; Zorio *et al*, 2008), les patientes pré-éclampsiques et celles dont le fœtus présente un retard de croissance intra-utérin (Estelles *et al*, 1989; Estelles *et al*, 1994; Estelles *et al*, 1998; Redman & Sargent, 2005). En conséquence, nous nous sommes particulièrement intéressés au rôle de PAI-1 au cours de la placentation dans un modèle murin.

Malgré le rôle largement documenté de PAI-1 dans la fibrinolyse, l'invasion et la migration cellulaires, de même que sa surexpression chez les femmes pré-éclampsiques, son rôle exact au cours de la placentation n'a jamais été élucidé. Ainsi, la première partie de notre travail a consisté à évaluer l'impact d'une déficience en PAI-1 sur la placentation murine. La comparaison d'unités fœto-placentaires issues d'un accouplement entre souris homozygotes déficientes en PAI-1 (PAI-1^{-/-}) à des unités fœto-placentaires provenant des souris sauvages correspondantes (PAI-1^{+/+}) révèle des anomalies morphologiques au niveau du labyrinthe à 10.5 jours de gestation, moment où le placenta murin est formé (Cross *et al*, 1994). Ces anomalies, observées morphologiquement et confirmées par quantification, sont essentiellement associées à une prolifération excessive des cellules

trophoblastiques formant un réseau cellulaire dense et peu infiltré par des vaisseaux sanguins. De même, une réduction de la taille du labyrinthe aux jours 10.5 et 12.5 de gestation a été observée chez les souris PAI-1^{-/-} par rapport aux souris PAI-1^{+/+}.

Les anomalies observées dans notre étude témoignent clairement d'un défaut de migration et d'invasion des cellules trophoblastiques au niveau du labyrinthe à 10.5 jours de gestation et au niveau du spongiotrophoblaste à 12.5 jours de gestation. En effet, la migration et l'invasion trophoblastiques constituent des mécanismes indispensables à l'établissement d'une placentation correcte. L'efficacité de ces mécanismes dépend étroitement de la structure de la matrice extracellulaire (MEC) et des interactions cellule-matrice. PAI-1, en tant que protéine multifonctionnelle, capable d'interagir avec des récepteurs membranaires (uPAR, intégrines), des protéines de la matrice (vitronectine) et des enzymes protéolytiques (tPA et uPA), est une molécule clé dans la régulation de ces mécanismes (Lee CC & Huang TS, 2005). L'absence de PAI-1 peut consolider la liaison de l'uPAR au domaine somatomédine B de la vitronectine et des intégrines à la région RGD de la vitronectine également, et ainsi inhiber la migration des cellules trophoblastiques.

Par ailleurs, la pré-éclampsie, qui est caractérisée par un défaut d'invasion trophoblastique, est associée à une augmentation de l'expression de PAI-1 (Estelles *et al*, 1998; Redman & Sargent, 2005) probablement modulée par les *hypoxia inducible transcription factor 1a et 2a* (HIF-1a et 2a) (Koklanaris *et al*, 2006; Meade *et al*, 2007). Des études réalisées à partir de cultures d'explants placentaires et de cultures de cellules trophoblastiques humaines HTR-8/SVneo montrent que le TNF- α inhibe la migration cellulaire via l'induction de l'expression de PAI-1 (Bauer *et al*, 2004; Huber *et al*, 2006). Ces résultats, contradictoires à nos observations, sont probablement liés à un excès de PAI-1 empêchant la formation de la plasmine. Ce taux diminué de plasmine préserve la matrice d'une dégradation par sa capacité à limiter l'activation plasmine-dépendante des MMPs, de même que la protéolyse de différentes protéines matricielles comme la vitronectine, la laminine et le collagène IV. La migration cellulaire implique le déplacement des cellules sur un substrat. Elle nécessite la mise en place d'un processus séquentiel d'attachement et de détachement caractérisés par des modifications morphologiques de la cellule. Ainsi, l'excès de PAI-1, dans le cas de la pré-éclampsie, inhiberait la liaison de l'uPAR et des intégrines à la vitronectine, privant ainsi l'attachement des cellules trophoblastiques à leurs substrats, processus qui est indispensable à la migration et à l'invasion cellulaires. Finalement, la déficience et l'excès en PAI-1 engendrent le même effet inhibiteur sur l'invasion trophoblastique. Les mêmes effets ont déjà été constatés par plusieurs équipes sur le rôle pro- ou anti-angiogène de

PAI-1 en fonction de sa concentration, sur le développement tumoral, la néo-vascularisation choroïdienne et le bourgeonnement de néo-vaisseaux dans le modèle des anneaux d'aorte et le modèle des membranes chorioallantoïdes (Stefansson *et al*, 2001; Devy *et al*, 2002; Lambert *et al*, 2003; Bajou *et al*, 2004). L'absence d'un dépôt de laminine, de fibrine ou de collagène IV au niveau du labyrinthe des souris PAI-1^{-/-} témoigne que les anomalies observées ne sont pas dues à un excès de protéolyse induit par la conversion non contrôlée du plasminogène en plasmine. Alternativement, une fonction récemment décrite de PAI-1 consiste en le contrôle de l'apoptose des cellules endothéliales. En effet, la plasmine clive le Fas Ligand (FasL) et induit la formation d'un facteur soluble pro-apoptotique. PAI-1 protégerait les cellules endothéliales de l'apoptose en inhibant la formation de la plasmine (Bajou *et al*, 2008).

L'expression de l'ARNm codant pour PAI-1 est confinée à la zone de jonction entre la décidue et le labyrinthe. En effet, après 10.5 jours de gestation, son expression est localisée au niveau des cellules géantes et après 11.5 jours de gestation, elle s'étend au niveau du spongiotrophoblaste non invasif. De même, il est exprimé par les cellules trophoblastiques entourant les vaisseaux maternels au niveau du labyrinthe (Teesalu *et al*, 1998). Cette régulation d'expression spatio-temporelle de PAI-1 corrèle avec le phénotype transitoire observé. Néanmoins, des facteurs de compensation pourraient également prendre le relais sur PAI-1, plus tard au cours de la gestation, et expliquer le rétablissement de la morphologie placentaire à 14.5 jours de gestation. En effet, il a été démontré que la déficience combinée en plasminogène et en MMPs est nécessaire pour observer une létalité embryonnaire (Solberg *et al*, 2003). Ces données confirment la complémentarité des deux systèmes protéolytiques dans divers processus biologiques. Des systèmes de compensation impliquant des facteurs angiogènes tels que le FGF-1 ont été mis en évidence dans un modèle tumoral chez des souris PAI-1 déficientes (Maillard *et al*, 2008). Toutefois l'analyse de l'expression du FGF-1 au niveau des sites d'implantations des souris PAI-1^{+/+} et PAI-1^{-/-} n'a révélé aucune différence. Cependant, d'autres facteurs angiogènes pourraient compenser la déficience en PAI-1. Dans ce contexte une analyse par microarray des sites d'implantation à 10.5 et 14.5 jours de gestation apporterait une réponse. Cette étude est actuellement en cours.

Dans la seconde partie de ce travail, nous nous sommes focalisés sur l'analyse de l'expression des MMPs dans l'endomètre de femmes exposé à court ou à long terme à un système intra-utérin à libération de progestatif, le Levonorgestrel (SIU-LNG), ainsi que sur l'impact de ce progestatif sur la vascularisation endométriale. Depuis quelques années, les MMPs sont reconnues comme acteurs principaux dans l'angiogenèse et la

progression tumorale. En effet, les inhibiteurs dirigés contre les MMPs font et ont fait l'objet de plusieurs projets de recherche et de tests cliniques comme agents thérapeutiques dans des traitements anticancéreux (Folgueras *et al*, 2004). Les MMPs contribuent également au développement et à la progression de divers pathologies gynécologiques citées précédemment, à savoir, l'endométriose (Di Carlo *et al*, 2008;Palei *et al*, 2008), la pré-éclampsie (Cockle *et al*, 2007;Galewska *et al*, 2008) et les saignements endométriaux sous progestatif (Guttinger & Critchley, 2007;Hickey & Salamonsen, 2008).

Les MMPs font partie des systèmes protéolytiques les plus décrits durant le cycle menstruel, essentiellement au moment des menstruations (Dong *et al*, 2002;Salamonsen *et al*, 2002;Salamonsen, 2003), mais également dans les saignements anormaux provoqués par l'utilisation d'une contraception progestative (Hickey *et al*, 2006). Parmi les moyens de contraception commercialisés, grâce à ses multiples avantages, le système intra-utérin à libération de Levonorgestrel, mieux connu sous le nom de Mirena® compte parmi les plus utilisés. Néanmoins, les saignements ou «spotting» constatés dans les 6 premiers mois de son utilisation restent l'inconvénient majeur de ce système. Les récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone sont présents au niveau des cellules épithéliales, stromales et endothéliales endométriales. En conséquence, chaque compartiment de l'endomètre peut être influencé par les variations hormonales et peut alors seul, ou en concert avec les autres types cellulaires, jouer un rôle dans les métrorragies dysfonctionnelles. Cependant, l'ultime raison des saignements reste l'altération et le dysfonctionnement des vaisseaux sanguins endométriaux. Il nous a ainsi semblé intéressant, d'une part, d'analyser dans cette seconde partie du travail, les différents degrés de maturité vasculaire, et d'autre part, d'analyser l'expression des MMPs qui jouent un rôle non négligeable en amont du phénomène final : «les saignements».

Les composants de la matrice extracellulaire jouent un rôle très important dans le développement des néo-vaisseaux, non seulement par leur rôle de support, mais également en servant de réservoir pour des facteurs de croissance. En effet, plusieurs de ces facteurs sont séquestrés dans la matrice extracellulaire et peuvent être clivés par des protéases, telles que les MMPs. Une fois libres, ces facteurs contribuent à plusieurs effets biologiques (Carmeliet, 2004). Les MMPs présentent une grande capacité à provoquer un «switch» angiogénique par le clivage de facteurs, tels que le VEGF qui stimule la prolifération des cellules endothéliales et la formation de néo-vaisseaux sanguins.

La régulation de l'expression des MMPs endométriales par les progestatifs n'a été étudiée que de manière fragmentaire. Diverses équipes ont montré l'augmentation de l'expression de quelques MMPs, telles que la MMP-1 (Milne *et al*, 2001; Vincent *et al*, 2000; Galant *et al*, 2000), la MMP-3 (Vincent *et al*, 2000; Marbaix *et al*, 2000; Oliveira-Ribeiro *et al*, 2004), la MMP-9 (Skinner *et al*, 1999) et la MMP-26 (Chegini *et al*, 2003) après utilisation d'un progestatif en intra-utérin (Mirena®) ou sous-cutané (Norplant® ou Implanon®). Dans notre étude, nous avons montré que l'expression de nombreuses MMPs est augmentée simultanément après une courte période d'utilisation d'un SIU-LNG. Cette augmentation est souvent associée à des saignements irréguliers. A plus long terme, lorsque les saignements sont moins fréquents, nous avons montré que l'expression de ces MMPs est diminuée, voir absente, pour certaines d'entre elles. En parallèle à cette stimulation d'expression des MMPs, nous avons également démontré une augmentation significativement importante du nombre de vaisseaux sanguins chez les femmes utilisant un stérilet à libération hormonale par rapport aux femmes en cycles spontanés. Les mêmes résultats ont été également observés chez les femmes sous Norplant® (Rogers *et al*, 1993; Hickey *et al*, 1999).

Ainsi, si nous partons de l'hypothèse selon laquelle la néovascularisation observée dans les groupes sous progestatif est en partie liée aux MMPs, une augmentation de facteurs angiogéniques pourrait être démontrée dans ces groupes. Cette stimulation a en effet été observée par Roopa et ses collaborateurs qui ont montré une augmentation de l'expression du VEGF, FGF et TGF- β chez les utilisatrices d'un SIU-LNG (Roopa *et al*, 2003). Ainsi, l'augmentation de l'expression de ces MMPs pourrait, d'une part, induire une néovascularisation endométriale, via la libération de facteurs angiogéniques, et d'autre part, participer activement à la dégradation des composants de la MEC et des membranes basales (Curry, Jr. & Osteen, 2003).

Le développement d'un réseau vasculaire fonctionnel nécessite une organisation tubulaire des cellules endothéliales et leur maturation en structures stables. La maturation des vaisseaux sanguins requiert le recrutement de cellules murales ainsi que le développement d'une matrice extracellulaire de soutien. Parmi les cellules murales, on distingue les cellules musculaires lisses et les péricytes. Ces derniers constituent une population cellulaire hétérogène en contact étroit avec les cellules endothéliales. Ils contiennent des myofilaments et expriment l'«*Alpha-Smooth Muscle Actin*» (α -SMA) et la desmine, ce qui suggère une origine commune des péricytes et des cellules musculaires lisses (Chantrain *et al*, 2006). Ces cellules de soutien maintiennent les vaisseaux et les stabilisent ; on parle alors de vaisseaux matures. Par contre, en l'absence de cellules périvasculaires, les vaisseaux sanguins sont fragilisés et sont susceptibles de se rompre

et de saigner ; ces vaisseaux sont alors appelés vaisseaux immatures. L'identification du marqueur α -SMA sur nos coupes d'endomètre dans les trois groupes de biopsies étudiés, nous a permis de classer les vaisseaux sanguins endométriaux selon leur degré de maturité. Les résultats montrent une augmentation significative du nombre de vaisseaux dépourvus de tunique péricytaire (immatures) dans les deux groupes sous Levonorgestrel par rapport au groupe contrôle témoignant d'un défaut de recrutement de cellules murales et de stabilisation des vaisseaux sanguins. Cette réduction de maturité vasculaire endométriale sous progestatif a été également observée par d'autres équipes (Hickey *et al*, 2000; Rogers *et al*, 2000). Plusieurs molécules, telles que le PDGF-B et Ang-1 contribue à cette stabilisation. En effet, une diminution de l'expression d'Ang-1 a été observée chez les femmes bénéficiant d'un traitement progestatif local intra-utérin (Krikun *et al*, 2002)

Nos résultats montrent que le Levonorgestrel utilisé comme progestatif associé au dispositif intra-utérin stimule l'expression de diverses MMPs par les cellules stromales et/ou déciduales (MMP-1, -2 et -3), les cellules épithéliales (MMP-7) et les cellules inflammatoires (MMP-9 et -12). Ces MMPs vont jouer un double rôle : (1) induire une angiogenèse anormale résultant en des vaisseaux fragiles ; (2) induire la fragilisation de la matrice extracellulaire en dégradant ses composants ainsi que les membranes basales des vaisseaux sanguins. Ces deux grands processus vont engendrer les saignements ou les «spotting» induits par le progestatif (Figure 1).

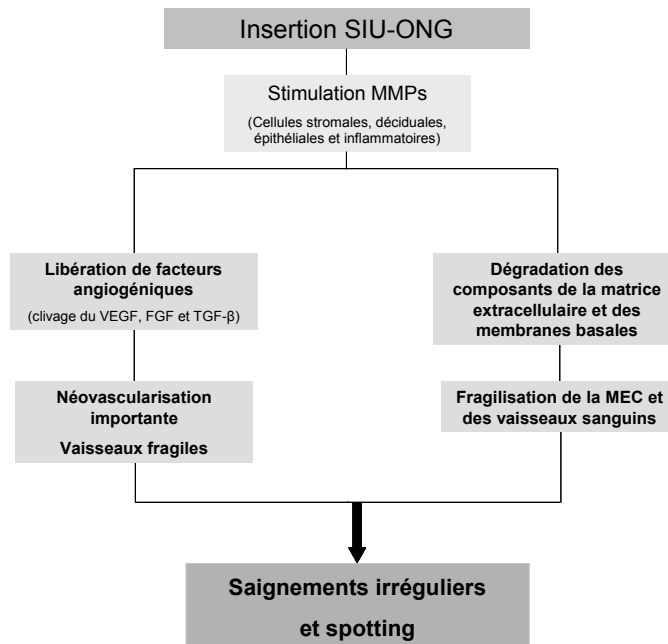


Figure 1 : Résumé des effets engendrés par un SIU-LNG sur l'endomètre et les saignements qui y sont associés.

Face à la problématique des saignements irréguliers sous progestatif, plusieurs équipes ont essayé de mettre au point des thérapies afin de les stopper ou les réduire. Diverses molécules ont été testées sur des volontaires sous contraception progestative et présentant des saignements. Parmi ces molécules, la mifepristone (Cheng *et al*, 2000; Massai *et al*, 2004; Weisberg *et al*, 2006), la doxycycline (Weisberg *et al*, 2006) et l'acide tranéxamique ont significativement réduit le nombre de jours de saignement ou de spotting. Outre son effet antibiotique, la doxycycline peut exercer un rôle anti-inflammatoire. Des études *in vitro* sur culture de cellules endométriales montrent que la doxycycline inhibe l'expression de diverses cytokines pro-inflammatoires (Li *et al*, 2006) ainsi que l'expression de MMPs (Li *et al*, 2007). C'est via ces deux voies que cette molécule réduirait les saignements.

En conclusion, nous avons montré dans le premier chapitre de notre travail que la déficience en PAI-1 inhibe la migration et l'invasion des deux types de cellules trophoblastiques présents dans le labyrinthe. D'une part, les cellules multinucléées qui constituent le syncytiotrophoblaste et qui vont former un réseau cellulaire dense dans lequel les vaisseaux sanguins fœtaux ne peuvent plus migrer ; d'autre part, les trophoblastes mononucléés délimitant les sinus sanguins maternels qui ne peuvent plus migrer pour former des structures pseudo-tubulaires (Voir Figure 18B, Introduction). La déficience en PAI-1 dans notre modèle murin et l'augmentation de l'expression de PAI-1 dans le cas de pré-éclampsie confirment que le maintien d'un taux physiologique de PAI-1 se révèle essentiel à la migration correcte des cellules trophoblastiques.

Dans le second volet de cette étude, nous avons clairement montré que la diminution des saignements ou des spottings associés à l'utilisation d'un SIU-LNG pourrait être liée au changement du profil d'expression de ces MMPs. L'association d'un inhibiteur des MMPs au stérilet, avec un principe actif libéré uniquement les premiers mois pourrait ainsi présenter une solution définitive à ces saignements. Même si les inhibiteurs de MMPs n'ont pas démontré leur efficacité en thérapie anticancéreuse (Mannello *et al*, 2005), leur efficacité dans le cadre d'une libération locale au niveau de l'endomètre n'a pas encore été investiguée.

VI-Perspectives

Dans la première partie de nos travaux, nous avons montré que la déficience en PAI-1 engendre un phénotype transitoire sur la placentation murine. Afin de déterminer le rôle combiné des métalloprotéases et du système plasminogène/plasmine au cours de la placentation, nous envisageons de traiter des souris PAI-1^{-/-} avec un inhibiteur des MMPs à large spectre (Ex : BB94, Galardine...). Les injections seront réalisées durant la période d'implantation (entre 4 et 5 *post coïtum*) et à 8.5 et 10.5 jours de gestation. Cette analyse nous permettra, d'une part, d'élucider le rôle des deux systèmes protéolytiques, et d'autre part, de déterminer la période exacte durant laquelle ces molécules interviennent.

Depuis peu, nous maîtrisons au sein de notre laboratoire des techniques de transplantation de tissu endométrial humain à des souris immunodéficientes. En effet, la transplantation sous-cutanée de fragments d'endomètre durant 4 semaines chez les souris SCID montre que le tissu humain y prolifère et garde une histologie comparable à celle de l'endomètre eutopique. Nous avons mis en évidence qu'une connexion entre le réseau vasculaire du tissu greffé et celui de l'hôte s'établissait. Suite à la mise au point de ce modèle, nous avons traité ces souris transplantées avec du Levonorgestrel en vue de reproduire les effets du progestatif observés chez les femmes sous Mirena®. Par la suite, nous envisageons d'administrer aux souris, des inhibiteurs de MMPs qui pourraient bloquer les saignements induits par le progestatif. L'objectif final de ces travaux sera de tester l'association des inhibiteurs de MMPs au stérilet à libération de Levonorgestrel dans le but d'inhiber les métrorragies dysfonctionnelles.

VII-Bibliographie

- Abberton,K.M., Healy,D.L., & Rogers,P.A. (1999) Smooth muscle alpha actin and myosin heavy chain expression in the vascular smooth muscle cells surrounding human endometrial arterioles. *Hum.Reprod.*, **14**, 3095-3100.
- Adamson,S.L., Lu,Y., Whiteley,K.J., Holmyard,D., Hemberger,M., Pfarrer,C., & Cross,J.C. (2002) Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. *Dev.Biol.*, **250**, 358-373.
- Afonso,S., Romagnano,L., & Babiarz,B. (1999) Expression of cathepsin proteinases by mouse trophoblast in vivo and in vitro. *Dev.Dyn.*, **216**, 374-384.
- Aghion,J. & Poirier,F. (2000) La biologie de l'implantation. *Médecines/sciences*, **16**, 324-328.
- Ahmad,S. & Ahmed,A. (2004) Elevated placental soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 inhibits angiogenesis in preeclampsia. *Circ.Res.*, **95**, 884-891.
- Alexander,C.M., Hansell,E.J., Behrendtsen,O., Flannery,M.L., Kishnani,N.S., Hawkes,S.P., & Werb,Z. (1996) Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation. *Development*, **122**, 1723-1736.
- Andreasen,P.A., Kjoller,L., Christensen,L., & Duffy,M.J. (1997) The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int.J.Cancer*, **72**, 1-22.
- Anson-Cartwright,L., Dawson,K., Holmyard,D., Fisher,S.J., Lazzarini,R.A., & Cross,J.C. (2000) The glial cells missing-1 protein is essential for branching morphogenesis in the chorioallantoic placenta. *Nat.Genet.*, **25**, 311-314.
- Aplin,J.D. (1997) Adhesion molecules in implantation. *Rev.Reprod.*, **2**, 84-93.
- Aplin,J.D., Meseguer,M., Simon,C., Ortiz,M.E., Croxatto,H., & Jones,C.J. (2001) MUC1, glycans and the cell-surface barrier to embryo implantation. *Biochem.Soc.Trans.*, **29**, 153-156.
- Arici,A., Seli,E., Zeyneloglu,H.B., Senturk,L.M., Oral,E., & Olive,D.L. (1998) Interleukin-8 induces proliferation of endometrial stromal cells: a potential autocrine growth factor. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **83**, 1201-1205.
- Arman,E., Haffner-Krausz,R., Chen,Y., Heath,J.K., & Lonai,P. (1998) Targeted disruption of fibroblast growth factor (FGF) receptor 2 suggests a role for FGF signaling in pregastrulation mammalian development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **95**, 5082-5087.
- Armulik,A., Abramsson,A., & Betsholtz,C. (2005) Endothelial/pericyte interactions. *Circ.Res.*, **97**, 512-523.
- Astedt,B., Hagerstrand,I., & Lecander,I. (1986) Cellular localisation in placenta of placental type plasminogen activator inhibitor. *Thromb.Haemost.*, **56**, 63-65.

- Avilion,A.A., Nicolis,S.K., Pevny,L.H., Perez,L., Vivian,N., & Lovell-Badge,R. (2003) Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.*, **17**, 126-140.
- Bacharach,E., Itin,A., & Keshet,E. (1992) In vivo patterns of expression of urokinase and its inhibitor PAI-1 suggest a concerted role in regulating physiological angiogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **89**, 10686-10690.
- Bagavandoss,P. & Wilks,J.W. (1990) Specific inhibition of endothelial cell proliferation by thrombospondin. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **170**, 867-872.
- Bajou,K., Maillard,C., Jost,M., Lijnen,R.H., Gils,A., Declerck,P., Carmeliet,P., Foidart,J.M., & Noel,A. (2004) Host-derived plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) concentration is critical for in vivo tumoral angiogenesis and growth. *Oncogene*, **23**, 6986-6990.
- Bajou,K., Masson,V., Gerard,R.D., Schmitt,P.M., Albert,V., Praus,M., Lund,L.R., Frandsen,T.L., Brunner,N., Dano,K., Fusenig,N.E., Weidle,U., Carmeliet,G., Loskutoff,D., Collen,D., Carmeliet,P., Foidart,J.M., & Noel,A. (2001) The plasminogen activator inhibitor PAI-1 controls in vivo tumor vascularization by interaction with proteases, not vitronectin. Implications for antiangiogenic strategies. *J.Cell Biol.*, **152**, 777-784.
- Bajou,K., Noel,A., Gerard,R.D., Masson,V., Brunner,N., Holst-Hansen,C., Skobe,M., Fusenig,N.E., Carmeliet,P., Collen,D., & Foidart,J.M. (1998) Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat.Med.*, **4**, 923-928.
- Bajou,K., Peng,H., Laug,W.E., Maillard,C., Noel,A., Foidart,J.M., Martial,J.A., & DeClerck,Y.A. (2008) Plasminogen activator inhibitor-1 protects endothelial cells from FasL-mediated apoptosis. *Cancer Cell*, **14**, 324-334.
- Baker,A.H., George,S.J., Zaltsman,A.B., Murphy,G., & Newby,A.C. (1999) Inhibition of invasion and induction of apoptotic cell death of cancer cell lines by overexpression of TIMP-3. *Br.J.Cancer*, **79**, 1347-1355.
- Baker,A.H., Zaltsman,A.B., George,S.J., & Newby,A.C. (1998) Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, or -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation, and death in vitro. TIMP-3 promotes apoptosis. *J.Clin.Invest*, **101**, 1478-1487.
- Baldwin,A.S., Jr. (1996) The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu.Rev.Immunol.*, **14**, 649-683.
- Bangert,K., Johnsen,A.H., Christensen,U., & Thorsen,S. (1993) Different N-terminal forms of alpha 2-plasmin inhibitor in human plasma. *Biochem.J.*, **291 (Pt 2)**, 623-625.
- Bany,B.M., Harvey,M.B., & Schultz,G.A. (2000) Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in the mouse uterus during implantation and oil-induced decidualization. *J.Reprod.Fertil.*, **120**, 125-134.

- Bany,B.M. & Schultz,G.A. (2001) Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-3 expression in the mouse uterus during implantation and artificially induced decidualization. *Mol.Reprod.Dev.*, **59**, 159-167.
- Basyuk,E., Cross,J.C., Corbin,J., Nakayama,H., Hunter,P., Nait-Oumesmar,B., & Lazzarini,R.A. (1999) Murine Gcm1 gene is expressed in a subset of placental trophoblast cells. *Dev.Dyn.*, **214**, 303-311.
- Bauer,S., Pollheimer,J., Hartmann,J., Husslein,P., Aplin,J.D., & Knofler,M. (2004) Tumor necrosis factor-alpha inhibits trophoblast migration through elevation of plasminogen activator inhibitor-1 in first-trimester villous explant cultures. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **89**, 812-822.
- Behrendtsen,O., Alexander,C.M., & Werb,Z. (1992) Metalloproteinases mediate extracellular matrix degradation by cells from mouse blastocyst outgrowths. *Development*, **114**, 447-456.
- Bertaux,B., Hornebeck,W., Eisen,A.Z., & Dubertret,L. (1991) Growth stimulation of human keratinocytes by tissue inhibitor of metalloproteinases. *J.Invest Dermatol.*, **97**, 679-685.
- Bilinski,P., Roopenian,D., & Gossler,A. (1998) Maternal IL-11Ralpha function is required for normal decidua and fetoplacental development in mice. *Genes Dev.*, **12**, 2234-2243.
- Boudjelal,M., Taneja,R., Matsubara,S., Bouillet,P., Dolle,P., & Chambon,P. (1997) Overexpression of Stra13, a novel retinoic acid-inducible gene of the basic helix-loop-helix family, inhibits mesodermal and promotes neuronal differentiation of P19 cells. *Genes Dev.*, **11**, 2052-2065.
- Braga,V.M. & Gendler,S.J. (1993) Modulation of Muc-1 mucin expression in the mouse uterus during the estrus cycle, early pregnancy and placentation. *J.Cell Sci.*, **105 (Pt 2)**, 397-405.
- Brenner,R.M., Nayak,N.R., Slayden,O.D., Critchley,H.O., & Kelly,R.W. (2002) Premenstrual and menstrual changes in the macaque and human endometrium: relevance to endometriosis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **955**, 60-74.
- Brogi,E., Wu,T., Namiki,A., & Isner,J.M. (1994) Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circulation*, **90**, 649-652.
- Bruse,C., Bergqvist,A., Carlstrom,K., Fianu-Jonasson,A., Lecander,I., & Astedt,B. (1998) Fibrinolytic factors in endometriotic tissue, endometrium, peritoneal fluid, and plasma from women with endometriosis and in endometrium and peritoneal fluid from healthy women. *Fertil.Steril.*, **70**, 821-826.
- Bruse,C., Radu,D., & Bergqvist,A. (2004) In situ localization of mRNA for the fibrinolytic factors uPA, PAI-1 and uPAR in endometriotic and endometrial tissue. *Mol.Hum.Reprod.*, **10**, 159-166.

- Bugge, T.H., Suh, T.T., Flick, M.J., Daugherty, C.C., Romer, J., Solberg, H., Ellis, V., Dano, K., & Degen, J.L. (1995) The receptor for urokinase-type plasminogen activator is not essential for mouse development or fertility. *J.Biol.Chem.*, **270**, 16886-16894.
- Carmeliet, P. (2004) Manipulating angiogenesis in medicine. *J.Intern.Med.*, **255**, 538-561.
- Carmeliet, P., Bouche, A., De Clercq, C., Janssen, S., Pollefeyt, S., Wyns, S., Mulligan, R.C., & Collen, D. (1995) Biological effects of disruption of the tissue-type plasminogen activator, urokinase-type plasminogen activator, and plasminogen activator inhibitor-1 genes in mice. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **748**, 367-381.
- Carmeliet, P., Kieckens, L., Schoonjans, L., Ream, B., van Nuffelen, A., Prendergast, G., Cole, M., Bronson, R., Collen, D., & Mulligan, R.C. (1993) Plasminogen activator inhibitor-1 gene-deficient mice. I. Generation by homologous recombination and characterization. *J.Clin.Invest*, **92**, 2746-2755.
- Carmeliet, P., Schoonjans, L., Kieckens, L., Ream, B., Degen, J., Bronson, R., De Vos, R., van den Oord, J.J., Collen, D., & Mulligan, R.C. (1994) Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature*, **368**, 419-424.
- Carson, D.D., Bagchi, I., Dey, S.K., Enders, A.C., Fazleabas, A.T., Lessey, B.A., & Yoshinaga, K. (2000) Embryo implantation. *Dev.Biol.*, **223**, 217-237.
- Carson, D.D., DeSouza, M.M., Kardon, R., Zhou, X., Lagow, E., & Julian, J. (1998) Mucin expression and function in the female reproductive tract. *Hum.Reprod.Update.*, **4**, 459-464.
- Casslen, B. & Astedt, B. (1981) Fibrinolytic activity of human uterine fluid. *Acta Obstet.Gynecol.Scand.*, **60**, 55-58.
- Casslen, B. & Astedt, B. (1983) Occurrence of both urokinase and tissue plasminogen activator in the human endometrium. *Contraception*, **28**, 553-564.
- Casslen, B., Nordengren, J., Gustavsson, B., Nilbert, M., & Lund, L.R. (1995) Progesterone stimulates degradation of urokinase plasminogen activator (u-PA) in endometrial stromal cells by increasing its inhibitor and surface expression of the u-PA receptor. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **80**, 2776-2784.
- Chakraborti, S., Mandal, M., Das, S., Mandal, A., & Chakraborti, T. (2003) Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol.Cell Biochem.*, **253**, 269-285.
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., & Smith, A. (2003) Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, **113**, 643-655.
- Chantrain, C.F., Henriot, P., Jodele, S., Emonard, H., Feron, O., Courtoy, P.J., DeClerck, Y.A., & Marbaix, E. (2006) Mechanisms of pericyte recruitment in tumour angiogenesis: a new role for metalloproteinases. *Eur.J.Cancer*, **42**, 310-318.
- Charnock-Jones, D.S., Macpherson, A.M., Archer, D.F., Leslie, S., Makkink, W.K., Sharkey, A.M., & Smith, S.K. (2000) The effect of progestins on vascular endothelial

- growth factor, oestrogen receptor and progesterone receptor immunoreactivity and endothelial cell density in human endometrium. *Hum.Reprod.*, **15 Suppl 3**, 85-95.
- Charnock-Jones,D.S., Sharkey,A.M., Rajput-Williams,J., Burch,D., Schofield,J.P., Fountain,S.A., Boocock,C.A., & Smith,S.K. (1993) Identification and localization of alternately spliced mRNAs for vascular endothelial growth factor in human uterus and estrogen regulation in endometrial carcinoma cell lines. *Biol.Reprod.*, **48**, 1120-1128.
- Chauchereau,A., Savouret,J.F., & Milgrom,E. (1992) Control of biosynthesis and post-transcriptional modification of the progesterone receptor. *Biol.Reprod.*, **46**, 174-177.
- Chegini,N., Rhoton-Vlasak,A., & Williams,R.S. (2003) Expression of matrix metalloproteinase-26 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-3 and -4 in endometrium throughout the normal menstrual cycle and alteration in users of levonorgestrel implants who experience irregular uterine bleeding. *Fertil.Steril.*, **80**, 564-570.
- Cheng,L., Zhu,H., Wang,A., Ren,F., Chen,J., & Glasier,A. (2000) Once a month administration of mifepristone improves bleeding patterns in women using subdermal contraceptive implants releasing levonorgestrel. *Hum.Reprod.*, **15**, 1969-1972.
- Ciambrone,G.J. & McKeown-Longo,P.J. (1990) Plasminogen activator inhibitor type I stabilizes vitronectin-dependent adhesions in HT-1080 cells. *J.Cell Biol.*, **111**, 2183-2195.
- Clapp,C., Martial,J.A., Guzman,R.C., Rentier-Delure,F., & Weiner,R.I. (1993) The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology*, **133**, 1292-1299.
- Clark,J.C., Thomas,D.M., Choong,P.F., & Dass,C.R. (2007) RECK--a newly discovered inhibitor of metastasis with prognostic significance in multiple forms of cancer. *Cancer Metastasis Rev.*, **26**, 675-683.
- Cockle,J.V., Gopichandran,N., Walker,J.J., Levene,M.I., & Orsi,N.M. (2007) Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in preterm perinatal complications. *Reprod.Sci.*, **14**, 629-645.
- Collins,J. & Crosignani,P.G. (2007) Endometrial bleeding. *Hum.Reprod.Update.*, **13**, 421-431.
- Colnot,C., Fowlis,D., Ripoché,M.A., Bouchaert,I., & Poirier,F. (1998) Embryonic implantation in galectin 1/galectin 3 double mutant mice. *Dev.Dyn.*, **211**, 306-313.
- Critchley,H.O., Brenner,R.M., Henderson,T.A., Williams,K., Nayak,N.R., Slayden,O.D., Millar,M.R., & Saunders,P.T. (2001) Estrogen receptor beta, but not estrogen receptor alpha, is present in the vascular endothelium of the human and nonhuman primate endometrium. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **86**, 1370-1378.
- Critchley,H.O., Wang,H., Jones,R.L., Kelly,R.W., Drudy,T.A., Gebbie,A.E., Buckley,C.H., McNeilly,A.S., & Glasier,A.F. (1998) Morphological and functional features of endometrial decidualization following long-term intrauterine levonorgestrel delivery. *Hum.Reprod.*, **13**, 1218-1224.

- Cross,J.C. (2000) Genetic insights into trophoblast differentiation and placental morphogenesis. *Semin.Cell Dev.Biol.*, **11**, 105-113.
- Cross,J.C., Anson-Cartwright,L., & Scott,I.C. (2002a) Transcription factors underlying the development and endocrine functions of the placenta. *Recent Prog.Horm.Res.*, **57**, 221-234.
- Cross,J.C., Flannery,M.L., Blonar,M.A., Steingrimsson,E., Jenkins,N.A., Copeland,N.G., Rutter,W.J., & Werb,Z. (1995) Hxt encodes a basic helix-loop-helix transcription factor that regulates trophoblast cell development. *Development*, **121**, 2513-2523.
- Cross,J.C., Hemberger,M., Lu,Y., Nozaki,T., Whiteley,K., Masutani,M., & Adamson,S.L. (2002b) Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta. *Mol.Cell Endocrinol.*, **187**, 207-212.
- Cross,J.C., Simmons,D.G., & Watson,E.D. (2003) Chorioallantoic morphogenesis and formation of the placental villous tree. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **995**, 84-93.
- Cross,J.C., Werb,Z., & Fisher,S.J. (1994) Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science*, **266**, 1508-1518.
- Croy,B.A., Ashkar,A.A., Minhas,K., & Greenwood,J.D. (2000) Can murine uterine natural killer cells give insights into the pathogenesis of preeclampsia? *J.Soc.Gynecol.Investig.*, **7**, 12-20.
- Curry,T.E., Jr. & Osteen,K.G. (2003) The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endocr.Rev.*, **24**, 428-465.
- Das,S.K., Wang,X.N., Paria,B.C., Damm,D., Abraham,J.A., Klagsbrun,M., Andrews,G.K., & Dey,S.K. (1994) Heparin-binding EGF-like growth factor gene is induced in the mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site of its apposition: a possible ligand for interaction with blastocyst EGF-receptor in implantation. *Development*, **120**, 1071-1083.
- Das,S.K., Yano,S., Wang,J., Edwards,D.R., Nagase,H., & Dey,S.K. (1997) Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in the mouse uterus during the peri-implantation period. *Dev.Genet.*, **21**, 44-54.
- Deng,G., Curriden,S.A., Hu,G., Czekay,R.P., & Loskutoff,D.J. (2001) Plasminogen activator inhibitor-1 regulates cell adhesion by binding to the somatomedin B domain of vitronectin. *J.Cell Physiol*, **189**, 23-33.
- Devy,L., Blacher,S., Grignet-Debrus,C., Bajou,K., Masson,V., Gerard,R.D., Gils,A., Carmeliet,G., Carmeliet,P., Declerck,P.J., Noel,A., & Foidart,J.M. (2002) The pro- or antiangiogenic effect of plasminogen activator inhibitor 1 is dose dependent. *FASEB J.*, **16**, 147-154.
- Di Carlo,C., Bonifacio,M., Tommaselli,G.A., Bifulco,G., Guerra,G., & Nappi,C. (2008) Metalloproteinases, vascular endothelial growth factor, and angiotensin 1 and 2 in eutopic and ectopic endometrium. *Fertil.Steril.*

- Dong,J.C., Dong,H., Campana,A., & Bischof,P. (2002) Matrix metalloproteinases and their specific tissue inhibitors in menstruation. *Reproduction.*, **123**, 621-631.
- Downie,J., Poyser,N.L., & Wunderlich,M. (1974) Levels of prostaglandins in human endometrium during the normal menstrual cycle. *J.Physiol*, **236**, 465-472.
- Eliceiri,B.P. & Cheresch,D.A. (1999) The role of alphav integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *J.Clin.Invest*, **103**, 1227-1230.
- Espana,F., Estelles,A., Fernandez,P.J., Gilabert,J., Sanchez-Cuenca,J., & Griffin,J.H. (1993) Evidence for the regulation of urokinase and tissue type plasminogen activators by the serpin, protein C inhibitor, in semen and blood plasma. *Thromb.Haemost.*, **70**, 989-994.
- Estelles,A., Gilabert,J., Aznar,J., Loskutoff,D.J., & Schleef,R.R. (1989) Changes in the plasma levels of type 1 and type 2 plasminogen activator inhibitors in normal pregnancy and in patients with severe preeclampsia. *Blood*, **74**, 1332-1338.
- Estelles,A., Gilabert,J., Grancha,S., Yamamoto,K., Thinnes,T., Espana,F., Aznar,J., & Loskutoff,D.J. (1998) Abnormal expression of type 1 plasminogen activator inhibitor and tissue factor in severe preeclampsia. *Thromb.Haemost.*, **79**, 500-508.
- Estelles,A., Gilabert,J., Keeton,M., Eguchi,Y., Aznar,J., Grancha,S., Espana,F., Loskutoff,D.J., & Schleef,R.R. (1994) Altered expression of plasminogen activator inhibitor type 1 in placentas from pregnant women with preeclampsia and/or intrauterine fetal growth retardation. *Blood*, **84**, 143-150.
- Farrar,J.D. & Carson,D.D. (1992) Differential temporal and spatial expression of mRNA encoding extracellular matrix components in decidua during the peri-implantation period. *Biol.Reprod.*, **46**, 1095-1108.
- Feinberg,R.F., Kao,L.C., Haimowitz,J.E., Queenan,J.T., Jr., Wun,T.C., Strauss,J.F., III, & Kliman,H.J. (1989) Plasminogen activator inhibitor types 1 and 2 in human trophoblasts. PAI-1 is an immunocytochemical marker of invading trophoblasts. *Lab Invest*, **61**, 20-26.
- Feldman,B., Poueymirou,W., Papaioannou,V.E., DeChiara,T.M., & Goldfarb,M. (1995) Requirement of FGF-4 for postimplantation mouse development. *Science*, **267**, 246-249.
- Ferrara,N. (2004) Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr.Rev.*, **25**, 581-611.
- Ferriani,R.A., Charnock-Jones,D.S., Prentice,A., Thomas,E.J., & Smith,S.K. (1993) Immunohistochemical localization of acidic and basic fibroblast growth factors in normal human endometrium and endometriosis and the detection of their mRNA by polymerase chain reaction. *Hum.Reprod.*, **8**, 11-16.
- Floridon,C., Nielsen,O., Holund,B., Sweep,F., Sunde,L., Thomsen,S.G., & Teisner,B. (2000) Does plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) control trophoblast invasion? A study

- of fetal and maternal tissue in intrauterine, tubal and molar pregnancies. *Placenta*, **21**, 754-762.
- Folgueras,A.R., Pendas,A.M., Sanchez,L.M., & Lopez-Otin,C. (2004) Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int.J.Dev.Biol.*, **48**, 411-424.
- Freitas,S., Meduri,G., Le Nestour,E., Bausero,P., & Perrot-Applanat,M. (1999) Expression of metalloproteinases and their inhibitors in blood vessels in human endometrium. *Biol.Reprod.*, **61**, 1070-1082.
- Fujishita,A., Nakane,P.K., Koji,T., Masuzaki,H., Chavez,R.O., Yamabe,T., & Ishimaru,T. (1997) Expression of estrogen and progesterone receptors in endometrium and peritoneal endometriosis: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Fertil.Steril.*, **67**, 856-864.
- Galant,C., Berliere,M., Dubois,D., Verougstraete,J.C., Charles,A., Lemoine,P., Kokorine,I., Eeckhout,Y., Courtoy,P.J., & Marbaix,E. (2004) Focal expression and final activity of matrix metalloproteinases may explain irregular dysfunctional endometrial bleeding. *Am.J.Pathol.*, **165**, 83-94.
- Galant,C., Vekemans,M., Lemoine,P., Kokorine,I., Twagirayezu,P., Henriet,P., Picquet,C., Rigot,V., Eeckhout,Y., Courtoy,P.J., & Marbaix,E. (2000) Temporal and spatial association of matrix metalloproteinases with focal endometrial breakdown and bleeding upon progestin-only contraception. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **85**, 4827-4834.
- Galewska,Z., Romanowicz,L., Jaworski,S., & Bankowski,E. (2008) Gelatinase matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 of the umbilical cord blood in preeclampsia. *Clin.Chem.Lab Med.*, **46**, 517-522.
- Gambino,L.S., Wreford,N.G., Bertram,J.F., Dockery,P., Lederman,F., & Rogers,P.A. (2002) Angiogenesis occurs by vessel elongation in proliferative phase human endometrium. *Hum.Reprod.*, **17**, 1199-1206.
- Gargett,C.E., Lederman,F., Heryanto,B., Gambino,L.S., & Rogers,P.A. (2001) Focal vascular endothelial growth factor correlates with angiogenesis in human endometrium. Role of intravascular neutrophils. *Hum.Reprod.*, **16**, 1065-1075.
- Gargett,C.E., Lederman,F.L., Lau,T.M., Taylor,N.H., & Rogers,P.A. (1999) Lack of correlation between vascular endothelial growth factor production and endothelial cell proliferation in the human endometrium. *Hum.Reprod.*, **14**, 2080-2088.
- Garside,R., Stein,K., Wyatt,K., Round,A., & Price,A. (2004) The effectiveness and cost-effectiveness of microwave and thermal balloon endometrial ablation for heavy menstrual bleeding: a systematic review and economic modelling. *Health Technol.Assess.*, **8**, iii, 1-iii155.
- Gerhardt,H. & Betsholtz,C. (2003) Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res.*, **314**, 15-23.

- Giangrande,P.H. & McDonnell,D.P. (1999) The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. *Recent Prog.Horm.Res.*, **54**, 291-313.
- Gilabert-Estelles,J., Castello,R., Gilabert,J., Ramon,L.A., Espana,F., Romeu,A., & Estelles,A. (2005) Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors in endometriosis. *Front Biosci.*, **10**, 1162-1176.
- Gilabert-Estelles,J., Ramon,L.A., Espana,F., Gilabert,J., Vila,V., Reganon,E., Castello,R., Chirivella,M., & Estelles,A. (2007) Expression of angiogenic factors in endometriosis: relationship to fibrinolytic and metalloproteinase systems. *Hum.Reprod.*, **22**, 2120-2127.
- Girling,J.E. & Rogers,P.A. (2005) Recent advances in endometrial angiogenesis research. *Angiogenesis.*, **8**, 89-99.
- Goffin,F., Munaut,C., Frankenne,F., Perrier,D.S., Beliard,A., Fridman,V., Nervo,P., Colige,A., & Foidart,J.M. (2003) Expression pattern of metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix-metalloproteinases in cycling human endometrium. *Biol.Reprod.*, **69**, 976-984.
- Goodger,A.M. & Rogers,P.A. (1993) Uterine endothelial cell proliferation before and after embryo implantation in rats. *J.Reprod.Fertil.*, **99**, 451-457.
- Greene,G.L., Gilna,P., Waterfield,M., Baker,A., Hort,Y., & Shine,J. (1986) Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science*, **231**, 1150-1154.
- Grondahl-Hansen,J., Christensen,I.J., Rosenquist,C., Brunner,N., Mouridsen,H.T., Dano,K., & Blichert-Toft,M. (1993) High levels of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in cytosolic extracts of breast carcinomas are associated with poor prognosis. *Cancer Res.*, **53**, 2513-2521.
- GROSS,J. & Lapiere,C.M. (1962) Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **48**, 1014-1022.
- Guillemot,F., Nagy,A., Auerbach,A., Rossant,J., & Joyner,A.L. (1994) Essential role of Mash-2 in extraembryonic development. *Nature*, **371**, 333-336.
- Gurtner,G.C., Davis,V., Li,H., McCoy,M.J., Sharpe,A., & Cybulsky,M.I. (1995) Targeted disruption of the murine VCAM1 gene: essential role of VCAM-1 in chorioallantoic fusion and placentation. *Genes Dev.*, **9**, 1-14.
- Gutierrez,L.S., Schulman,A., Brito-Robinson,T., Noria,F., Ploplis,V.A., & Castellino,F.J. (2000) Tumor development is retarded in mice lacking the gene for urokinase-type plasminogen activator or its inhibitor, plasminogen activator inhibitor-1. *Cancer Res.*, **60**, 5839-5847.
- Guttinger,A. & Critchley,H.O. (2007) Endometrial effects of intrauterine levonorgestrel. *Contraception*, **75**, S93-S98.

- Hague,S., MacKenzie,I.Z., Bicknell,R., & Rees,M.C. (2002) In-vivo angiogenesis and progestogens. *Hum.Reprod.*, **17**, 786-793.
- Hampton,A.L. & Salamonsen,L.A. (1994) Expression of messenger ribonucleic acid encoding matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors is related to menstruation. *J.Endocrinol.*, **141**, R1-R3.
- Hanahan,D. & Folkman,J. (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, **86**, 353-364.
- Harbeck,N., Kruger,A., Sinz,S., Kates,R.E., Thomssen,C., Schmitt,M., & Janicke,F. (2001) Clinical relevance of the plasminogen activator inhibitor type 1--a multifaceted proteolytic factor. *Onkologie.*, **24**, 238-244.
- Hastings,J.M., Licence,D.R., Burton,G.J., Charnock-Jones,D.S., & Smith,S.K. (2003) Soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 inhibits edema and epithelial proliferation induced by 17beta-estradiol in the mouse uterus. *Endocrinology*, **144**, 326-334.
- Hayakawa,T., Yamashita,K., Ohuchi,E., & Shinagawa,A. (1994) Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *J.Cell Sci.*, **107 (Pt 9)**, 2373-2379.
- Hayman,R., Brockelsby,J., Kenny,L., & Baker,P. (1999) Preeclampsia: the endothelium, circulating factor(s) and vascular endothelial growth factor. *J.Soc.Gynecol.Investig.*, **6**, 3-10.
- Hemberger,M., Nozaki,T., Masutani,M., & Cross,J.C. (2003) Differential expression of angiogenic and vasodilatory factors by invasive trophoblast giant cells depending on depth of invasion. *Dev.Dyn.*, **227**, 185-191.
- Herman,M.P., Sukhova,G.K., Kisiel,W., Foster,D., Kehry,M.R., Libby,P., & Schonbeck,U. (2001) Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with implications for atherosclerosis. *J.Clin.Invest*, **107**, 1117-1126.
- Heryanto,B. & Rogers,P.A. (2002) Regulation of endometrial endothelial cell proliferation by oestrogen and progesterone in the ovariectomized mouse. *Reproduction.*, **123**, 107-113.
- Hess,S., Kanse,S.M., Kost,C., & Preissner,K.T. (1995) The versatility of adhesion receptor ligands in haemostasis: morpho-regulatory functions of vitronectin. *Thromb.Haemost.*, **74**, 258-265.
- Hewett,P., Nijjar,S., Shams,M., Morgan,S., Gupta,J., & Ahmed,A. (2002) Down-regulation of angiopoietin-1 expression in menorrhagia. *Am.J.Pathol.*, **160**, 773-780.
- Hewitt,S.C., Harrell,J.C., & Korach,K.S. (2005) Lessons in estrogen biology from knockout and transgenic animals. *Annu.Rev.Physiol*, **67**, 285-308.
- Hewitt,S.C. & Korach,K.S. (2002) Estrogen receptors: structure, mechanisms and function. *Rev.Endocr.Metab Disord.*, **3**, 193-200.

- Hickey,M., Crewe,J., Mahoney,L.A., Doherty,D.A., Fraser,I.S., & Salamonsen,L.A. (2006) Mechanisms of irregular bleeding with hormone therapy: the role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **91**, 3189-3198.
- Hickey,M., Dwarte,D., & Fraser,I.S. (2000) Superficial endometrial vascular fragility in Norplant users and in women with ovulatory dysfunctional uterine bleeding. *Hum.Reprod.*, **15**, 1509-1514.
- Hickey,M. & Salamonsen,L.A. (2008) Endometrial structural and inflammatory changes with exogenous progestogens. *Trends Endocrinol.Metab*, **19**, 167-174.
- Hickey,M., Simbar,M., Markham,R., Young,L., Manconi,F., Russell,P., & Fraser,I.S. (1999) Changes in vascular basement membrane in the endometrium of Norplant users. *Hum.Reprod.*, **14**, 716-721.
- Hii,L.L. & Rogers,P.A. (1998) Endometrial vascular and glandular expression of integrin alpha(v)beta3 in women with and without endometriosis. *Hum.Reprod.*, **13**, 1030-1035.
- Hirchenhain,J., Huse,I., Hess,A., Bielfeld,P., De Bruyne,F., & Krussel,J.S. (2003) Differential expression of angiopoietins 1 and 2 and their receptor Tie-2 in human endometrium. *Mol.Hum.Reprod.*, **9**, 663-669.
- Hofmann,G.E., Glatstein,I., Schatz,F., Heller,D., & Deligdisch,L. (1994) Immunohistochemical localization of urokinase-type plasminogen activator and the plasminogen activator inhibitors 1 and 2 in early human implantation sites. *Am.J.Obstet.Gynecol.*, **170**, 671-676.
- Holmes,W.E., Nelles,L., Lijnen,H.R., & Collen,D. (1987) Primary structure of human alpha 2-antiplasmin, a serine protease inhibitor (serpin). *J.Biol.Chem.*, **262**, 1659-1664.
- Hu,Z.Y., Liu,Y.X., Liu,K., Byrne,S., Ny,T., Feng,Q., & Ockleford,C.D. (1999) Expression of tissue type and urokinase type plasminogen activators as well as plasminogen activator inhibitor type-1 and type-2 in human and rhesus monkey placenta. *J.Anat.*
- Huber,A.V., Saleh,L., Bauer,S., Husslein,P., & Knofler,M. (2006) TNFalpha-mediated induction of PAI-1 restricts invasion of HTR-8/SVneo trophoblast cells. *Placenta*, **27**, 127-136.
- Hulboy,D.L., Rudolph,L.A., & Matrisian,L.M. (1997) Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Mol.Hum.Reprod.*, **3**, 27-45.
- Hyder,S.M., Nawaz,Z., Chiappetta,C., & Stancel,G.M. (2000) Identification of functional estrogen response elements in the gene coding for the potent angiogenic factor vascular endothelial growth factor. *Cancer Res.*, **60**, 3183-3190.
- Iruela-Arispe,M.L., Bornstein,P., & Sage,H. (1991) Thrombospondin exerts an antiangiogenic effect on cord formation by endothelial cells in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **88**, 5026-5030.

- Iruela-Arispe, M.L., Porter, P., Bornstein, P., & Sage, E.H. (1996) Thrombospondin-1, an inhibitor of angiogenesis, is regulated by progesterone in the human endometrium. *J.Clin.Invest*, **97**, 403-412.
- Iruela-Arispe, M.L., Rodriguez-Manzaneque, J.C., & Abu-Jawdeh, G. (1999) Endometrial endothelial cells express estrogen and progesterone receptors and exhibit a tissue specific response to angiogenic growth factors. *Microcirculation.*, **6**, 127-140.
- Jain, R.K. (2003) Molecular regulation of vessel maturation. *Nat.Med.*, **9**, 685-693.
- Jondet, M., Letellier, B., & Verdys, M.T. (2005) Endometrial vascularization in levonorgestrel intrauterine device users; computerized microvessel measurement study. *Contraception*, **71**, 60-64.
- Karpanen, T. & Alitalo, K. (2008) Molecular Biology and Pathology of Lymphangiogenesis. *Annu.Rev.Pathol.*, **3**, 367-397.
- Kawano, T., Morimoto, K., & Uemura, Y. (1970) Partial purification and properties of urokinase inhibitor from human placenta. *J.Biochem.(Tokyo)*, **67**, 333-342.
- Kayisli, U.A., Luk, J., Guzeloglu-Kayisli, O., Seval, Y., Demir, R., & Arici, A. (2004) Regulation of angiogenic activity of human endometrial endothelial cells in culture by ovarian steroids. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **89**, 5794-5802.
- Keller, N.R., Sierra-Rivera, E., Eisenberg, E., & Osteen, K.G. (2000) Progesterone exposure prevents matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) stimulation by interleukin-1alpha in human endometrial stromal cells. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **85**, 1611-1619.
- Khalil, N., Corne, S., Whitman, C., & Yacyshyn, H. (1996) Plasmin regulates the activation of cell-associated latent TGF-beta 1 secreted by rat alveolar macrophages after in vivo bleomycin injury. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*, **15**, 252-259.
- Kietzmann, T., Roth, U., & Jungermann, K. (1999) Induction of the plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by mild hypoxia via a hypoxia response element binding the hypoxia-inducible factor-1 in rat hepatocytes. *Blood*, **94**, 4177-4185.
- Kimber, S.J. (2005) Leukaemia inhibitory factor in implantation and uterine biology. *Reproduction.*, **130**, 131-145.
- Kirkland, J.L., Murthy, L., & Stancel, G.M. (1992) Progesterone inhibits the estrogen-induced expression of c-fos messenger ribonucleic acid in the uterus. *Endocrinology*, **130**, 3223-3230.
- Klaffky, E., Williams, R., Yao, C.C., Ziober, B., Kramer, R., & Sutherland, A. (2001) Trophoblast-specific expression and function of the integrin alpha 7 subunit in the peri-implantation mouse embryo. *Dev.Biol.*, **239**, 161-175.
- Koklanaris, N., Nwachukwu, J.C., Huang, S.J., Guller, S., Karpisheva, K., Garabedian, M., & Lee, M.J. (2006) First-trimester trophoblast cell model gene response to hypoxia. *Am.J.Obstet.Gynecol.*, **194**, 687-693.

- Kraus, W.L., Montano, M.M., & Katzenellenbogen, B.S. (1993) Cloning of the rat progesterone receptor gene 5'-region and identification of two functionally distinct promoters. *Mol. Endocrinol.*, **7**, 1603-1616.
- Krikun, G., Critchley, H., Schatz, F., Wan, L., Caze, R., Baergen, R.N., & Lockwood, C.J. (2002) Abnormal uterine bleeding during progestin-only contraception may result from free radical-induced alterations in angiopoietin expression. *Am. J. Pathol.*, **161**, 979-986.
- Krikun, G., Schatz, F., Finlay, T., Kadner, S., Mesia, A., Gerrets, R., & Lockwood, C.J. (2000) Expression of angiopoietin-2 by human endometrial endothelial cells: regulation by hypoxia and inflammation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **275**, 159-163.
- Krikun, G., Schatz, F., & Lockwood, C.J. (2004) Endometrial angiogenesis: from physiology to pathology. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1034**, 27-35.
- Krikun, G., Schatz, F., Taylor, R., Critchley, H.O., Rogers, P.A., Huang, J., & Lockwood, C.J. (2005) Endometrial endothelial cell steroid receptor expression and steroid effects on gene expression. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **90**, 1812-1818.
- Kuiper, G.G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., & Gustafsson, J.A. (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 5925-5930.
- Kunath, T., Strumpf, D., & Rossant, J. (2004) Early trophoblast determination and stem cell maintenance in the mouse--a review. *Placenta*, **25 Suppl A**, S32-S38.
- Kushner, P.J., Agard, D.A., Greene, G.L., Scanlan, T.S., Shiao, A.K., Uht, R.M., & Webb, P. (2000) Estrogen receptor pathways to AP-1. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **74**, 311-317.
- Lamagna, C. & Bergers, G. (2006) The bone marrow constitutes a reservoir of pericyte progenitors. *J. Leukoc. Biol.*, **80**, 677-681.
- Lambert, V., Munaut, C., Carmeliet, P., Gerard, R.D., Declercq, P.J., Gils, A., Claes, C., Foidart, J.M., Noel, A., & Rakic, J.M. (2003) Dose-dependent modulation of choroidal neovascularization by plasminogen activator inhibitor type I: implications for clinical trials. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **44**, 2791-2797.
- Lambert, V., Munaut, C., Noel, A., Frankenne, F., Bajou, K., Gerard, R., Carmeliet, P., Defresne, M.P., Foidart, J.M., & Rakic, J.M. (2001) Influence of plasminogen activator inhibitor type 1 on choroidal neovascularization. *FASEB J.*, **15**, 1021-1027.
- Laoag-Fernandez, J.B., Maruo, T., Pakarinen, P., Spitz, I.M., & Johansson, E. (2003) Effects of levonorgestrel-releasing intra-uterine system on the expression of vascular endothelial growth factor and adrenomedullin in the endometrium in adenomyosis. *Hum. Reprod.*, **18**, 694-699.
- Lau, T.M., Affandi, B., & Rogers, P.A. (1999) The effects of levonorgestrel implants on vascular endothelial growth factor expression in the endometrium. *Mol. Hum. Reprod.*, **5**, 57-63.

- Lecce,G., Meduri,G., Ancelin,M., Bergeron,C., & Perrot-Applanat,M. (2001) Presence of estrogen receptor beta in the human endometrium through the cycle: expression in glandular, stromal, and vascular cells. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **86**, 1379-1386.
- Leco,K.J., Edwards,D.R., & Schultz,G.A. (1996) Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 is the major metalloproteinase inhibitor in the decidualizing murine uterus. *Mol.Reprod.Dev.*, **45**, 458-465.
- Leco,K.J., Khokha,R., Pavloff,N., Hawkes,S.P., & Edwards,D.R. (1994) Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) is an extracellular matrix-associated protein with a distinctive pattern of expression in mouse cells and tissues. *J.Biol.Chem.*, **269**, 9352-9360.
- Lee CC & Huang TS (2005) Plasminogen Activator Inhibitor-1: The expression, Biological function, and Effects on Tumorigenesis and Tumor Cell Adhesion and Migration. *Journal of Cancer Molecules*, **1**, 25-36.
- Lessey,B.A. (1997) Integrins and the endometrium: new markers of uterine receptivity. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **828**, 111-122.
- Li,R., Luo,X., Archer,D.F., & Chegini,N. (2007) Doxycycline alters the expression of matrix metalloproteinases in the endometrial cells exposed to ovarian steroids and pro-inflammatory cytokine. *J.Reprod.Immunol.*, **73**, 118-129.
- Li,R., Luo,X., Pan,Q., Zineh,I., Archer,D.F., Williams,R.S., & Chegini,N. (2006) Doxycycline alters the expression of inflammatory and immune-related cytokines and chemokines in human endometrial cells: implication in irregular uterine bleeding. *Hum.Reprod.*, **21**, 2555-2563.
- Li,X.F., Gregory,J., & Ahmed,A. (1994) Immunolocalisation of vascular endothelial growth factor in human endometrium. *Growth Factors*, **11**, 277-282.
- Lijnen,H.R. (2001) Elements of the fibrinolytic system. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **936**, 226-236.
- Lijnen,H.R. (2002) Matrix metalloproteinases and cellular fibrinolytic activity. *Biochemistry (Mosc.)*, **67**, 92-98.
- Lim,H., Gupta,R.A., Ma,W.G., Paria,B.C., Moller,D.E., Morrow,J.D., DuBois,R.N., Trzaskos,J.M., & Dey,S.K. (1999) Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPARdelta. *Genes Dev.*, **13**, 1561-1574.
- Lim,H., Paria,B.C., Das,S.K., Dinchuk,J.E., Langenbach,R., Trzaskos,J.M., & Dey,S.K. (1997) Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell*, **91**, 197-208.
- Lindenberg,S., Sundberg,K., Kimber,S.J., & Lundblad,A. (1988) The milk oligosaccharide, lacto-N-fucopentaose I, inhibits attachment of mouse blastocysts on endometrial monolayers. *J.Reprod.Fertil.*, **83**, 149-158.
- Liu,J., Chakraborty,C., Graham,C.H., Barbin,Y.P., Dixon,S.J., & Lala,P.K. (2003) Noncatalytic domain of uPA stimulates human extravillous trophoblast migration by

- using phospholipase C, phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase. *Exp. Cell Res.*, **286**, 138-151.
- Lydon,J.P., DeMayo,F.J., Funk,C.R., Mani,S.K., Hughes,A.R., Montgomery,C.A., Jr., Shyamala,G., Conneely,O.M., & O'Malley,B.W. (1995) Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev.*, **9**, 2266-2278.
- Ma,W., Tan,J., Matsumoto,H., Robert,B., Abrahamson,D.R., Das,S.K., & Dey,S.K. (2001) Adult tissue angiogenesis: evidence for negative regulation by estrogen in the uterus. *Mol.Endocrinol.*, **15**, 1983-1992.
- Maatta,M., Soini,Y., Liakka,A., & Autio-Harmanen,H. (2000) Localization of MT1-MMP, TIMP-1, TIMP-2, and TIMP-3 messenger RNA in normal, hyperplastic, and neoplastic endometrium. Enhanced expression by endometrial adenocarcinomas is associated with low differentiation. *Am.J.Clin.Pathol.*, **114**, 402-411.
- Macotela,Y., Aguilar,M.B., Guzman-Morales,J., Rivera,J.C., Zermeno,C., Lopez-Barrera,F., Nava,G., Lavalle,C., Martinez,d.I.E., & Clapp,C. (2006) Matrix metalloproteases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin. *J.Cell Sci.*, **119**, 1790-1800.
- Maillard,C., Bouquet,C., Petitjean,M., Mestdagt,M., Frau,E., Jost,M., Masset,A., Opolon,P., Beermann,F., Abitbol,M., Foidart,J.M., Perricaudet,M., & Noel,A. (2008) Reduction of brain metastases in plasminogen activator inhibitor-1 deficient mice with transgenic ocular tumors. *Carcinogenesis*.
- Maillard,C., Jost,M., Romer,M.U., Brunner,N., Houard,X., Lejeune,A., Munaut,C., Bajou,K., Melen,L., Dano,K., Carmeliet,P., Fusenig,N.E., Foidart,J.M., & Noel,A. (2005) Host plasminogen activator inhibitor-1 promotes human skin carcinoma progression in a stage-dependent manner. *Neoplasia.*, **7**, 57-66.
- Mannello,F., Tonti,G., & Papa,S. (2005) Matrix metalloproteinase inhibitors as anticancer therapeutics. *Curr.Cancer Drug Targets.*, **5**, 285-298.
- Marbaix,E., Donnez,J., Courtoy,P.J., & Eeckhout,Y. (1992) Progesterone regulates the activity of collagenase and related gelatinases A and B in human endometrial explants. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **89**, 11789-11793.
- Marbaix,E., Vekemans,M., Galant,C., Rigot,V., Lemoine,P., Dubois,D., Picquet,C., Henriot,P., Twagirayezu,P., Sufi,S., Eeckhout,Y., & Courtoy,P.J. (2000) Circulating sex hormones and endometrial stromelysin-1 (matrix metalloproteinase-3) at the start of bleeding episodes in levonorgestrel-implant users. *Hum.Reprod.*, **15 Suppl 3**, 120-134.
- Markee,J.E. (1978) Menstruation in intraocular endometrial transplants in the Rhesus monkey. *Am.J.Obstet.Gynecol.*, **131**, 558-559.
- Maruo,T., Laoag-Fernandez,J.B., Pakarinen,P., Murakoshi,H., Spitz,I.M., & Johansson,E. (2001) Effects of the levonorgestrel-releasing intrauterine system on proliferation and apoptosis in the endometrium. *Hum.Reprod.*, **16**, 2103-2108.

- Massai,M.R., Pavez,M., Fuentealba,B., Croxatto,H.B., & d'Arcangues,C. (2004) Effect of intermittent treatment with mifepristone on bleeding patterns in Norplant implant users. *Contraception*, **70**, 47-54.
- Matsuzaki,S., Fukaya,T., Suzuki,T., Murakami,T., Sasano,H., & Yajima,A. (1999) Oestrogen receptor alpha and beta mRNA expression in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Mol.Hum.Reprod.*, **5**, 559-564.
- McGavigan,C.J., Dockery,P., Metaxa-Mariatou,V., Campbell,D., Stewart,C.J., Cameron,I.T., & Campbell,S. (2003) Hormonally mediated disturbance of angiogenesis in the human endometrium after exposure to intrauterine levonorgestrel. *Hum.Reprod.*, **18**, 77-84.
- Meade,E.S., Ma,Y.Y., & Guller,S. (2007) Role of hypoxia-inducible transcription factors 1alpha and 2alpha in the regulation of plasminogen activator inhibitor-1 expression in a human trophoblast cell line. *Placenta*, **28**, 1012-1019.
- Meduri,G., Bausero,P., & Perrot-Appianat,M. (2000) Expression of vascular endothelial growth factor receptors in the human endometrium: modulation during the menstrual cycle. *Biol.Reprod.*, **62**, 439-447.
- Meisser,A., Chardonens,D., Campana,A., & Bischof,P. (1999) Effects of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 alpha, macrophage colony stimulating factor and transforming growth factor beta on trophoblastic matrix metalloproteinases. *Mol.Hum.Reprod.*, **5**, 252-260.
- Milne,S.A., Rakhyoot,A., Drudy,T.A., Brechin,S., Riley,S.C., & Critchley,H.O. (2001) Co-localization of matrix metalloproteinase-1 and mast cell tryptase in the human uterus. *Mol.Hum.Reprod.*, **7**, 559-565.
- Mints,M., Blomgren,B., Falconer,C., Fianu-Jonasson,A., & Palmblad,J. (2005) Microvascular density, vascular endothelial growth factor A, and its receptors in endometrial blood vessels in patients with menorrhagia. *Fertil.Steril.*, **84**, 692-700.
- Mirkin,S. & Archer,D.F. (2004) Effects of levonorgestrel, medroxyprogesterone acetate, norethindrone, progesterone, and 17beta-estradiol on thrombospondin-1 mRNA in Ishikawa cells. *Fertil.Steril.*, **82**, 220-222.
- Moller,B., Rasmussen,C., Lindblom,B., & Olovsson,M. (2001) Expression of the angiogenic growth factors VEGF, FGF-2, EGF and their receptors in normal human endometrium during the menstrual cycle. *Mol.Hum.Reprod.*, **7**, 65-72.
- Moller,B., Ronnerdag,M., Wang,G., Odland,V., & Olovsson,M. (2005) Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors in human endometrium from women experiencing abnormal bleeding patterns after prolonged use of a levonorgestrel-releasing intrauterine system. *Hum.Reprod.*, **20**, 1410-1417.
- Mueller,M.D., Lebovic,D.I., Garrett,E., & Taylor,R.N. (2000) Neutrophils infiltrating the endometrium express vascular endothelial growth factor: potential role in endometrial angiogenesis. *Fertil.Steril.*, **74**, 107-112.
- Mulac-Jericevic,B. & Conneely,O.M. (2004) Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction.*, **128**, 139-146.

- Murphy-Ullrich, J.E. & Hook, M. (1989) Thrombospondin modulates focal adhesions in endothelial cells. *J. Cell Biol.*, **109**, 1309-1319.
- Myohanen, H. & Vaheri, A. (2004) Regulation and interactions in the activation of cell-associated plasminogen. *Cell Mol. Life Sci.*, **61**, 2840-2858.
- Nakayama, H., Liu, Y., Stifani, S., & Cross, J.C. (1997) Developmental restriction of Mash-2 expression in trophoblast correlates with potential activation of the notch-2 pathway. *Dev. Genet.*, **21**, 21-30.
- Nayak, N.R. & Brenner, R.M. (2002) Vascular proliferation and vascular endothelial growth factor expression in the rhesus macaque endometrium. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **87**, 1845-1855.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H., & Smith, A. (1998) Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, **95**, 379-391.
- Nishida, Y., Hayashi, Y., Imai, Y., & Itoh, H. (1998) Expression and localization of the urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) in the human placenta. *Kobe J. Med. Sci.*, **44**, 31-43.
- Nordengren, J., Casslen, B., Gustavsson, B., Einarsdottir, M., & Willen, R. (1998) Discordant expression of mRNA and protein for urokinase and tissue plasminogen activators (u-PA, t-PA) in endometrial carcinoma. *Int. J. Cancer*, **79**, 195-201.
- Nordengren, J., Pilka, R., Noskova, V., Ehinger, A., Domanski, H., Andersson, C., Hoyer-Hansen, G., Hansson, S.R., & Casslen, B. (2004) Differential localization and expression of urokinase plasminogen activator (uPA), its receptor (uPAR), and its inhibitor (PAI-1) mRNA and protein in endometrial tissue during the menstrual cycle. *Mol. Hum. Reprod.*, **10**, 655-663.
- Norwitz, E.R., Snegovskikh, V., Schatz, F., Foyouzi, N., Rahman, M., Buchwalder, L., Lee, H.J., Funai, E.F., Buhimschi, C.S., Buhimschi, I.A., & Lockwood, C.J. (2007) Progesterin inhibits and thrombin stimulates the plasminogen activator/inhibitor system in term decidua stromal cells: implications for parturition. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **196**, 382-388.
- Noyes, R.W., Hertig, A.T., & Rock, J. (1975) Dating the endometrial biopsy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **122**, 262-263.
- Oehler, M.K., Rees, M.C., & Bicknell, R. (2000) Steroids and the endometrium. *Curr. Med. Chem.*, **7**, 543-560.
- Ogle, T.F., Dai, D., George, P., & Mahesh, V.B. (1997) Stromal cell progesterone and estrogen receptors during proliferation and regression of the decidua basalis in the pregnant rat. *Biol. Reprod.*, **57**, 495-506.
- Oliveira-Ribeiro, M., Petta, C.A., Angelo Andrade, L.A., Bahamondes, L., & Hidalgo, M.M. (2004) Correlation between endometrial histology, microvascular density and calibre, matrix metalloproteinase-3 and bleeding pattern in women using a levonorgestrel-releasing intrauterine system. *Hum. Reprod.*, **19**, 1778-1784.

- Ono, M. & Shiina, Y. (2001) Cytological evaluation of angiogenesis in endometrial aspirates. *Cytopathology*, **12**, 37-43.
- Palei, A.C., Sandrim, V.C., Cavalli, R.C., & Tanus-Santos, J.E. (2008) Comparative assessment of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9, and their inhibitors, tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 in preeclampsia and gestational hypertension. *Clin.Biochem.*, **41**, 875-880.
- Pappot, H., Pedersen, A.N., Brunner, N., & Christensen, I.J. (2006) The complex between urokinase (uPA) and its type-1 inhibitor (PAI-1) in pulmonary adenocarcinoma: relation to prognosis. *Lung Cancer*, **51**, 193-200.
- Parfyonova, Y.V., Plekhanova, O.S., & Tkachuk, V.A. (2002) Plasminogen activators in vascular remodeling and angiogenesis. *Biochemistry (Mosc.)*, **67**, 119-134.
- Paria, B.C., Lim, H., Das, S.K., Reese, J., & Dey, S.K. (2000) Molecular signaling in uterine receptivity for implantation. *Semin.Cell Dev.Biol.*, **11**, 67-76.
- Parr, E.L., Tung, H.N., & Parr, M.B. (1987) Apoptosis as the mode of uterine epithelial cell death during embryo implantation in mice and rats. *Biol.Reprod.*, **36**, 211-225.
- Pepper, M.S. & Mandriota, S.J. (1998) Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1) expression in vascular endothelial cells. *Exp.Cell Res.*, **241**, 414-425.
- Perrot-Applanat, M., Ancelin, M., Buteau-Lozano, H., Meduri, G., & Bausero, P. (2000) Ovarian steroids in endometrial angiogenesis. *Steroids*, **65**, 599-603.
- Perrot-Applanat, M., Deng, M., Fernandez, H., Lelaidier, C., Meduri, G., & Bouchard, P. (1994) Immunohistochemical localization of estradiol and progesterone receptors in human uterus throughout pregnancy: expression in endometrial blood vessels. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **78**, 216-224.
- Perrot-Applanat, M., Groyer-Picard, M.T., Garcia, E., Lorenzo, F., & Milgrom, E. (1988) Immunocytochemical demonstration of estrogen and progesterone receptors in muscle cells of uterine arteries in rabbits and humans. *Endocrinology*, **123**, 1511-1519.
- Pilka, R., Kudela, M., Eriksson, P., & Casslen, B. (2004) [Endometrial expression profiles of mRNA for selected matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases-1]. *Ceska.Gynekol.*, **69**, 472-476.
- Pilka, R., Noskova, V., Domanski, H., Andersson, C., Hansson, S., & Casslen, B. (2006) Endometrial TIMP-4 mRNA is expressed in the stroma, while TIMP-4 protein accumulates in the epithelium and is released to the uterine fluid. *Mol.Hum.Reprod.*, **12**, 497-503.
- Piwnica, D., Touraine, P., Struman, I., Tabruyn, S., Bolbach, G., Clapp, C., Martial, J.A., Kelly, P.A., & Goffin, V. (2004) Cathepsin D processes human prolactin into multiple 16K-like N-terminal fragments: study of their antiangiogenic properties and physiological relevance. *Mol.Endocrinol.*, **18**, 2522-2542.

- Poirier, F., Timmons, P.M., Chan, C.T., Guenet, J.L., & Rigby, P.W. (1992) Expression of the L14 lectin during mouse embryogenesis suggests multiple roles during pre- and post-implantation development. *Development*, **115**, 143-155.
- Pretto, C.M., Gaide Chevronnay, H.P., Cornet, P.B., Galant, C., Delvaux, D., Courtoy, P.J., Marbaix, E., & Henriot, P. (2008) Production of Interleukin-1 {alpha} by Human Endometrial Stromal Cells Is Triggered during Menses and Dysfunctional Bleeding and Is Induced in Culture by Epithelial Interleukin-1 {alpha} Released upon Ovarian Steroids Withdrawal. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*
- Pritts, E.A., Ryan, I.P., Mueller, M.D., Lebovic, D.I., Shifren, J.L., Zaloudek, C.J., Korn, A.P., Darney, P.D., & Taylor, R.N. (2005) Angiogenic effects of norplant contraception on endometrial histology and uterine bleeding. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, **90**, 2142-2147.
- Puente, X.S., Sanchez, L.M., Overall, C.M., & Lopez-Otin, C. (2003) Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat.Rev.Genet.*, **4**, 544-558.
- Rawdanowicz, T.J., Hampton, A.L., Nagase, H., Woolley, D.E., & Salamonsen, L.A. (1994) Matrix metalloproteinase production by cultured human endometrial stromal cells: identification of interstitial collagenase, gelatinase-A, gelatinase-B, and stromelysin-1 and their differential regulation by interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor-alpha. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, **79**, 530-536.
- Redman, C.W. & Sargent, I.L. (2005) Latest advances in understanding preeclampsia. *Science*, **308**, 1592-1594.
- Reynolds, L.P., Kirsch, J.D., Kraft, K.C., & Redmer, D.A. (1998) Time-course of the uterine response to estradiol-17beta in ovariectomized ewes: expression of angiogenic factors. *Biol.Reprod.*, **59**, 613-620.
- Rider, V. & Psychoyos, A. (1994) Inhibition of progesterone receptor function results in loss of basic fibroblast growth factor expression and stromal cell proliferation during uterine remodelling in the pregnant rat. *J.Endocrinol.*, **140**, 239-249.
- Rifkin, D.B., Mazzieri, R., Munger, J.S., Noguera, I., & Sung, J. (1999) Proteolytic control of growth factor availability. *APMIS*, **107**, 80-85.
- Riley, P., Anson-Cartwright, L., & Cross, J.C. (1998) The Hand1 bHLH transcription factor is essential for placentation and cardiac morphogenesis. *Nat.Genet.*, **18**, 271-275.
- Risau, W. & Flamme, I. (1995) Vasculogenesis. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.*, **11**, 73-91.
- Rodgers, W.H., Matrisian, L.M., Giudice, L.C., Dsupin, B., Cannon, P., Svitek, C., Gorstein, F., & Osteen, K.G. (1994) Patterns of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones. *J.Clin.Invest.*, **94**, 946-953.
- Rodgers, W.H., Osteen, K.G., Matrisian, L.M., Navre, M., Giudice, L.C., & Gorstein, F. (1993) Expression and localization of matrilysin, a matrix metalloproteinase, in human endometrium during the reproductive cycle. *Am.J.Obstet.Gynecol.*, **168**, 253-260.

- Rogers,P.A., Au,C.L., & Affandi,B. (1993) Endometrial microvascular density during the normal menstrual cycle and following exposure to long-term levonorgestrel. *Hum.Reprod.*, **8**, 1396-1404.
- Rogers,P.A., Plunkett,D., & Affandi,B. (2000) Perivascular smooth muscle alpha-actin is reduced in the endometrium of women with progestin-only contraceptive breakthrough bleeding. *Hum.Reprod.*, **15 Suppl 3**, 78-84.
- Roopa,B.A., Loganath,A., & Singh,K. (2003) The effect of a levonorgestrel-releasing intrauterine system on angiogenic growth factors in the endometrium. *Hum.Reprod.*, **18**, 1809-1819.
- Salamonsen,L.A. (2003) Tissue injury and repair in the female human reproductive tract. *Reproduction.*, **125**, 301-311.
- Salamonsen,L.A. & Lathbury,L.J. (2000) Endometrial leukocytes and menstruation. *Hum.Reprod.Update.*, **6**, 16-27.
- Salamonsen,L.A., Zhang,J., & Brasted,M. (2002) Leukocyte networks and human endometrial remodelling. *J.Reprod.Immunol.*, **57**, 95-108.
- Samathanam,C.A., Adesanya,O.O., Zhou,J., Wang,J., & Bondy,C.A. (1998) Fibroblast growth factors 1 and 2 in the primate uterus. *Biol.Reprod.*, **59**, 491-496.
- Sartorius,C.A., Melville,M.Y., Hovland,A.R., Tung,L., Takimoto,G.S., & Horwitz,K.B. (1994) A third transactivation function (AF3) of human progesterone receptors located in the unique N-terminal segment of the B-isoform. *Mol.Endocrinol.*, **8**, 1347-1360.
- Schatz,F., Aigner,S., Papp,C., Toth-Pal,E., Hausknecht,V., & Lockwood,C.J. (1995) Plasminogen activator activity during decidualization of human endometrial stromal cells is regulated by plasminogen activator inhibitor 1. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **80**, 2504-2510.
- Schroen,D.J. & Brinckerhoff,C.E. (1996) Nuclear hormone receptors inhibit matrix metalloproteinase (MMP) gene expression through diverse mechanisms. *Gene Expr.*, **6**, 197-207.
- Seki,N., Kodama,J., Hashimoto,I., Hongo,A., Yoshinouchi,M., & Kudo,T. (2001) Thrombospondin-1 and -2 messenger RNA expression in normal and neoplastic endometrial tissues: correlation with angiogenesis and prognosis. *Int.J.Oncol.*, **19**, 305-310.
- Shifren,J.L., Tseng,J.F., Zaloudek,C.J., Ryan,I.P., Meng,Y.G., Ferrara,N., Jaffe,R.B., & Taylor,R.N. (1996) Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **81**, 3112-3118.
- Shimada,T., Nakamura,H., Ohuchi,E., Fujii,Y., Murakami,Y., Sato,H., Seiki,M., & Okada,Y. (1999) Characterization of a truncated recombinant form of human membrane type 3 matrix metalloproteinase. *Eur.J.Biochem.*, **262**, 907-914.

- Shweiki,D., Itin,A., Neufeld,G., Gitay-Goren,H., & Keshet,E. (1993) Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. *J.Clin.Invest*, **91**, 2235-2243.
- Singer,C.F., Marbaix,E., Kokorine,I., Lemoine,P., Donnez,J., Eeckhout,Y., & Courtoy,P.J. (1997) Paracrine stimulation of interstitial collagenase (MMP-1) in the human endometrium by interleukin 1alpha and its dual block by ovarian steroids. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **94**, 10341-10345.
- Skinner,J.L., Riley,S.C., Gebbie,A.E., Glasier,A.F., & Critchley,H.O. (1999) Regulation of matrix metalloproteinase-9 in endometrium during the menstrual cycle and following administration of intrauterine levonorgestrel. *Hum.Reprod.*, **14**, 793.
- Smith,M.R., Kung,H., Durum,S.K., Colburn,N.H., & Sun,Y. (1997) TIMP-3 induces cell death by stabilizing TNF-alpha receptors on the surface of human colon carcinoma cells. *Cytokine*, **9**, 770-780.
- Smith,S.K. (2001) Regulation of angiogenesis in the endometrium. *Trends Endocrinol.Metab*, **12**, 147-151.
- Snijders,M.P., de Goeij,A.F., Debets-Te Baerts,M.J., Rousch,M.J., Koudstaal,J., & Bosman,F.T. (1992) Immunocytochemical analysis of oestrogen receptors and progesterone receptors in the human uterus throughout the menstrual cycle and after the menopause. *J.Reprod.Fertil.*, **94**, 363-371.
- Solberg,H., Rinkenberger,J., Dano,K., Werb,Z., & Lund,L.R. (2003) A functional overlap of plasminogen and MMPs regulates vascularization during placental development. *Development*, **130**, 4439-4450.
- Springman,E.B., Angleton,E.L., Birkedal-Hansen,H., & Van Wart,H.E. (1990) Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **87**, 364-368.
- Stefansson,S., Muhammad,S., Cheng,X.F., Battey,F.D., Strickland,D.K., & Lawrence,D.A. (1998) Plasminogen activator inhibitor-1 contains a cryptic high affinity binding site for the low density lipoprotein receptor-related protein. *J.Biol.Chem.*, **273**, 6358-6366.
- Stefansson,S., Petitclerc,E., Wong,M.K., McMahon,G.A., Brooks,P.C., & Lawrence,D.A. (2001) Inhibition of angiogenesis in vivo by plasminogen activator inhibitor-1. *J.Biol.Chem.*, **276**, 8135-8141.
- Stephens,L.E., Sutherland,A.E., Klimanskaya,I.V., Andrieux,A., Meneses,J., Pedersen,R.A., & Damsky,C.H. (1995) Deletion of beta 1 integrins in mice results in inner cell mass failure and peri-implantation lethality. *Genes Dev.*, **9**, 1883-1895.
- Sternlicht,M.D. & Werb,Z. (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.*, **17**, 463-516.
- Stewart,C.L., Kaspar,P., Brunet,L.J., Bhatt,H., Gadi,I., Kontgen,F., & Abbondanzo,S.J. (1992) Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*, **359**, 76-79.

- Strongin,A.Y., Collier,I., Bannikov,G., Marmer,B.L., Grant,G.A., & Goldberg,G.I. (1995) Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J.Biol.Chem.*, **270**, 5331-5338.
- Sturridge,F. & Guillebaud,J. (1997) Gynaecological aspects of the levonorgestrel-releasing intrauterine system. *Br.J.Obstet.Gynaecol.*, **104**, 285-289.
- Sutherland,A.E., Calarco,P.G., & Damsky,C.H. (1993) Developmental regulation of integrin expression at the time of implantation in the mouse embryo. *Development*, **119**, 1175-1186.
- Tabruyn,S.P., Sorlet,C.M., Rentier-Delrue,F., Bours,V., Weiner,R.I., Martial,J.A., & Struman,I. (2003) The antiangiogenic factor 16K human prolactin induces caspase-dependent apoptosis by a mechanism that requires activation of nuclear factor-kappaB. *Mol.Endocrinol.*, **17**, 1815-1823.
- Tanaka,S., Kunath,T., Hadjantonakis,A.K., Nagy,A., & Rossant,J. (1998) Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science*, **282**, 2072-2075.
- Tayade,C., Hilchie,D., He,H., Fang,Y., Moons,L., Carmeliet,P., Foster,R.A., & Croy,B.A. (2007) Genetic deletion of placenta growth factor in mice alters uterine NK cells. *J.Immunol.*, **178**, 4267-4275.
- Teesalu,T., Blasi,F., & Talarico,D. (1996) Embryo implantation in mouse: fetomaternal coordination in the pattern of expression of uPA, uPAR, PAI-1 and alpha 2MR/LRP genes. *Mech.Dev.*, **56**, 103-116.
- Teesalu,T., Blasi,F., & Talarico,D. (1998) Expression and function of the urokinase type plasminogen activator during mouse hemochorial placental development. *Dev.Dyn.*, **213**, 27-38.
- Teesalu,T., Masson,R., Basset,P., Blasi,F., & Talarico,D. (1999) Expression of matrix metalloproteinases during murine chorioallantoic placenta maturation. *Dev.Dyn.*, **214**, 248-258.
- Tibbetts,T.A., DeMayo,F., Rich,S., Conneely,O.M., & O'Malley,B.W. (1999) Progesterone receptors in the thymus are required for thymic involution during pregnancy and for normal fertility. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **96**, 12021-12026.
- Tolsma,S.S., Volpert,O.V., Good,D.J., Frazier,W.A., Polverini,P.J., & Bouck,N. (1993) Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity. *J.Cell Biol.*, **122**, 497-511.
- Torry,D.S., Holt,V.J., Keenan,J.A., Harris,G., Caudle,M.R., & Torry,R.J. (1996) Vascular endothelial growth factor expression in cycling human endometrium. *Fertil.Steril.*, **66**, 72-80.
- Tsampalas, C Charlet-Renard,S.B., M.L Alvarez, C Munaut, J-M Foidart, V.Geenen, & S.Perrier d'Hauterive (2007) Evaluation and quantification of luteinizing hormone receptor (LHR) expression in mouse endometrium along the estrus cycle. *en préparation.*

- Tsatsaris, V., Goffin, F., Munaut, C., Brichant, J.F., Pignon, M.R., Noel, A., Schaaps, J.P., Cabrol, D., Frankenne, F., & Foidart, J.M. (2003) Overexpression of the soluble vascular endothelial growth factor receptor in preeclamptic patients: pathophysiological consequences. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **88**, 5555-5563.
- Vazquez, F., Rodriguez-Manzaneque, J.C., Lydon, J.P., Edwards, D.P., O'Malley, B.W., & Iruela-Arispe, M.L. (1999) Progesterone regulates proliferation of endothelial cells. *J.Biol.Chem.*, **274**, 2185-2192.
- Vekemans, M. (1995) Use of long-acting contraceptives. *Lancet*, **346**, 1165.
- Vekemans, M., Delvigne, A., & Paesmans, M. (1997) Continuation rates with a levonorgestrel-releasing contraceptive implant (Norplant). A prospective study in Belgium. *Contraception*, **56**, 291-299.
- Vereide, A.B., Kaino, T., Sager, G., Arnes, M., & Orbo, A. (2006) Effect of levonorgestrel IUD and oral medroxyprogesterone acetate on glandular and stromal progesterone receptors (PRA and PRB), and estrogen receptors (ER-alpha and ER-beta) in human endometrial hyperplasia. *Gynecol.Oncol.*, **101**, 214-223.
- Vincent, A.J., Malakooti, N., Zhang, J., Rogers, P.A., Affandi, B., & Salamonsen, L.A. (1999) Endometrial breakdown in women using Norplant is associated with migratory cells expressing matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B). *Hum.Reprod.*, **14**, 807-815.
- Vincent, A.J. & Salamonsen, L.A. (2000) The role of matrix metalloproteinases and leukocytes in abnormal uterine bleeding associated with progestin-only contraceptives. *Hum.Reprod.*, **15**, 135.
- Vincent, A.J., Zhang, J., Ostor, A., Rogers, P.A., Affandi, B., Kovacs, G., & Salamonsen, L.A. (2000) Matrix metalloproteinase-1 and -3 and mast cells are present in the endometrium of women using progestin-only contraceptives. *Hum.Reprod.*, **15**, 123-130.
- Vincent, A.J., Zhang, J., Ostor, A., Rogers, P.A., Affandi, B., Kovacs, G., & Salamonsen, L.A. (2002) Decreased tissue inhibitor of metalloproteinase in the endometrium of women using depot medroxyprogesterone acetate: a role for altered endometrial matrix metalloproteinase/tissue inhibitor of metalloproteinase balance in the pathogenesis of abnormal uterine bleeding? *Hum.Reprod.*, **17**, 1189-1198.
- Walter, L.M., Rogers, P.A., & Girling, J.E. (2005) The role of progesterone in endometrial angiogenesis in pregnant and ovariectomised mice. *Reproduction*, **129**, 765-777.
- Wang, H., Critchley, H.O., Kelly, R.W., Shen, D., & Baird, D.T. (1998) Progesterone receptor subtype B is differentially regulated in human endometrial stroma. *Mol.Hum.Reprod.*, **4**, 407-412.
- Watson, E.D. & Cross, J.C. (2005) Development of structures and transport functions in the mouse placenta. *Physiology.(Bethesda.)*, **20**, 180-193.
- Wei, L.L., Gonzalez-Aller, C., Wood, W.M., Miller, L.A., & Horwitz, K.B. (1990) 5'-Heterogeneity in human progesterone receptor transcripts predicts a new amino-

- terminal truncated "C"-receptor and unique A-receptor messages. *Mol.Endocrinol.*, **4**, 1833-1840.
- Weisberg,E., Hickey,M., Palmer,D., O'Connor,V., Salamonsen,L.A., Findlay,J.K., & Fraser,I.S. (2006) A pilot study to assess the effect of three short-term treatments on frequent and/or prolonged bleeding compared to placebo in women using Implanon. *Hum.Reprod.*, **21**, 295-302.
- Whiteside,E.J., Jackson,M.M., Herington,A.C., Edwards,D.R., & Harvey,M.B. (2001) Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 are key regulators of extracellular matrix degradation by mouse embryos. *Biol.Reprod.*, **64**, 1331-1337.
- Wildemeersch,D. & Schacht,E. (2001) Treatment of menorrhagia with a novel 'frameless' intrauterine levonorgestrel-releasing drug delivery system: a pilot study. *Eur.J.Contracept.Reprod.Health Care*, **6**, 93-101.
- Will,H., Atkinson,S.J., Butler,G.S., Smith,B., & Murphy,G. (1996) The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase A and initiates autoproteolytic activation. Regulation by TIMP-2 and TIMP-3. *J.Biol.Chem.*, **271**, 17119-17123.
- Yan,C. & Boyd,D.D. (2007) Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J.Cell Physiol*, **211**, 19-26.
- Yancopoulos,G.D., Davis,S., Gale,N.W., Rudge,J.S., Wiegand,S.J., & Holash,J. (2000) Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, **407**, 242-248.
- Yang,J.T., Rayburn,H., & Hynes,R.O. (1995) Cell adhesion events mediated by alpha 4 integrins are essential in placental and cardiac development. *Development*, **121**, 549-560.
- Zhang,J., Hampton,A.L., Nie,G., & Salamonsen,L.A. (2000a) Progesterone inhibits activation of latent matrix metalloproteinase (MMP)-2 by membrane-type 1 MMP: enzymes coordinately expressed in human endometrium. *Biol.Reprod.*, **62**, 85-94.
- Zhang,J., Lathbury,L.J., & Salamonsen,L.A. (2000b) Expression of the chemokine eotaxin and its receptor, CCR3, in human endometrium. *Biol.Reprod.*, **62**, 404-411.
- Zhang,J., Nie,G., Jian,W., Woolley,D.E., & Salamonsen,L.A. (1998) Mast cell regulation of human endometrial matrix metalloproteinases: A mechanism underlying menstruation. *Biol.Reprod.*, **59**, 693-703.
- Zhang,J. & Salamonsen,L.A. (1997) Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1, -2 and -3 in human endometrium during the menstrual cycle. *Mol.Hum.Reprod.*, **3**, 735-741.
- Zhou,Y., Fisher,S.J., Janatpour,M., Genbacev,O., Dejana,E., Wheelock,M., & Damsky,C.H. (1997) Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *J.Clin.Invest*, **99**, 2139-2151.
- Zhu,H.H., Huang,J.R., Mazela,J., Elias,J., & Tseng,L. (1992) Progestin stimulates the biosynthesis of fibronectin and accumulation of fibronectin mRNA in human endometrial stromal cells. *Hum.Reprod.*, **7**, 141-146.

- Zhu,P., Liu,X., Luo,H., Gu,Z., Cheng,J., Xu,R., Lian,S., Wu,S., & Wang,J. (1999) The effect of a levonorgestrel-releasing intrauterine device on human endometrial oestrogen and progesterone receptors after one year of use. *Hum.Reprod.*, **14**, 970-975.
- Zhu,Z.M., Kojima,N., Stroud,M.R., Hakomori,S., & Fenderson,B.A. (1995) Monoclonal antibody directed to Le(y) oligosaccharide inhibits implantation in the mouse. *Biol.Reprod.*, **52**, 903-912.
- Zorio,E., Gilabert-Estelles,J., Espana,F., Ramon,L.A., Cosin,R., & Estelles,A. (2008) Fibrinolysis: the key to new pathogenetic mechanisms. *Curr.Med.Chem.*, **15**, 923-929.