



HAL
open science

Rôles du Facteur PréImplantatoire (PIF) dans le placenta humain normal et pathologique

Hadia Moindjie

► **To cite this version:**

Hadia Moindjie. Rôles du Facteur PréImplantatoire (PIF) dans le placenta humain normal et pathologique. Biologie du développement. Université Paris Saclay (COMUE), 2016. Français. NNT : 2016SACLV094 . tel-01508483

HAL Id: tel-01508483

<https://theses.hal.science/tel-01508483>

Submitted on 14 Apr 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

NNT : 2016SACLVO94

THESE DE DOCTORAT

DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
L'UNIVERSITE VERSAILLES-SAINT QUENTIN EN YVELINES

ECOLE DOCTORALE N° 577
Structure et dynamique des systèmes vivants

Spécialité de doctorat : Sciences de la Vie et de la Santé

Par

Madame Hadia MOINDJIE

Rôles du Facteur PréImplantatoire (PIF) dans le placenta humain normal et pathologique

Thèse présentée et soutenue à Montigny le Bretonneux, le 8 Novembre 2016

Composition du Jury :

Mme ROUILLER-FABRE Virginie	Professeur, Université Paris Diderot	Président-Rapporteur
M VAIMAN Daniel	Directeur de Recherche, Université Paris Descartes	Rapporteur
M SANDRA Olivier	Chargé de Recherche, Université Paris-Saclay	Examineur
M GRYNBERG Michaël	Professeur - PH, Université Paris XIII	Examineur
Mme DIEUDONNE Marie-Noëlle	Professeur, Université Paris Saclay	Co-directeur de thèse
M VIALARD François	Professeur - PH, Université Paris Saclay	Co-directeur de thèse

A mon père...je te continue

Remerciements

Je tiens à remercier l'ensemble du jury d'avoir accepté de juger mon travail. Je remercie Pr Virginie Rouiller-Fabre et Dr Daniel Vaiman pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Merci pour le temps que vous avez accordé à mon manuscrit et pour vos remarques afin de l'améliorer. Suivre vos enseignements lors de mes années universitaires ont été un privilège et un honneur pour moi. Je remercie également Dr Olivier Sandra et Pr Michael Grynberg pour avoir accepté d'examiner cette thèse.

Je souhaite remercier mon directeur de laboratoire et co-directeur de thèse François Vialard pour m'avoir invité à participer à cette expérience enrichissante. Merci pour ton humour, la confiance et la liberté que tu m'as accordé dans la gestion de ce projet. Tu m'as poussé à m'améliorer ces quatre dernières années et je te suis reconnaissante.

Je remercie également ma directrice de thèse Marie Noëlle Dieudonné pour son encadrement, ses enseignements et son dynamisme. Merci d'avoir été beaucoup plus qu'une directrice de thèse. Tu es la meilleure pédagogue que j'ai eu l'occasion de côtoyer et être ta thésarde a été une véritable chance pour moi. Je ressors grandie de cette expérience et prête à me lancer dans de nouvelles aventures afin de devenir un meilleur chercheur.

Au cours de cette thèse, j'ai eu la chance d'évoluer auprès d'une équipe formidable. Je remercie le Pr Philippe de Mazancourt de m'avoir ouvert les portes de son laboratoire lorsque je suis arrivée pour mon stage de Master 2. Je remercie les membres de l'EA 2493 et de l'EA 7404, Florence Quelin, Lucia Echevarria, Valérie Serazin, Mbarka Giudicelli, Florence Boitrelle et Paul Berveiller pour leurs conseils pertinents, leurs soutiens et les nombreuses conversations plus ou moins scientifiques que nous avons pu avoir. Un merci tout particulier

à Esther Dos Santos. Merci pour ta douceur, ta patience, ton aide précieuse dans l'acquisition des techniques, la rédaction des articles et dans la préparation aux communications orales et écrites.

Je remercie infiniment Maryse de Hauteur pour son soutien sans faille, ses nombreux conseils avisés et les longues conversations que nous avons eues.

Merci à Marie-José Garnier pour avoir effectué une énième correction de ce manuscrit.

Je remercie les membres de l'équipe d'Anatomopathologie du centre hospitalier de Poissy-Saint-Germain en Laye que j'ai beaucoup côtoyés au cours de cette thèse. Merci d'avoir fait de ce service ma première maison à l'hôpital de Poissy. Une pensée particulière pour Danielle, Bruno et Joanne.

Je tiens à remercier le Dr Denise-Molina Gomes qui est un modèle de chaleur humaine à mes yeux.

Je remercie également les services d'assistance médicale à la procréation, de gynécologie, d'anesthésie ainsi que le centre de prélèvement et le laboratoire de biologie médicale du centre hospitalier de Poissy-Saint Germain en Laye pour le recueil des échantillons biologiques précieux et pour avoir participé activement à ce projet. Merci aux patientes suivies à l'hôpital de Poissy qui ont accepté d'être incluses dans le protocole clinique PIF.

Merci à Benjamin Grandon, Rita Gouesse et Laurent Ruiz pour avoir participé à ce travail.

Ces quatre dernières années de laboratoire n'auraient pas été aussi belles sans mes collègues/amis. Merci Cécile Oheix, Justine Bessau, Benjamin Grandon, Laura Laencina pour les sorties, les nombreuses heures passées à discuter, à rigoler, à manger...et à manger !

J'ai eu la chance de partager mon bureau avec deux super co-locataires. Merci Dorothee Poidatz pour ta gentillesse, ton enthousiasme et ton accueil chaleureux lorsque j'ai intégré l'équipe. Merci Fabien Duval pour avoir été le meilleur binôme toutes catégories confondues. Travailler avec toi et partager ce bureau a été un réel bonheur. Notre complicité et nos conversations toujours très sérieuses me manqueront. Je te souhaite tout le bonheur possible dans tes projets futurs.

Merci à mon « partner in crime » Jérôme Lannes. Merci d'avoir été mon meilleur ami de mon arrivée sur Paris à aujourd'hui. T'avoir à mes côtés pendant ces années universitaires a éclairé mon aventure parisienne et permis de me créer des souvenirs incroyables.

J'aimerais remercier les personnes les plus importantes dans ma vie et sans qui je ne serai pas là aujourd'hui, ma famille. Merci à ma famille d'adoption parisienne Mariama, Chams, Mamou et Zarianty pour m'avoir accueillie les bras ouverts, pour m'avoir soutenue et pour avoir fait de moi une meilleure personne. Merci à mes frères et soeurs Amina, Hamza, Titi et Moussa pour m'avoir encouragée, pour avoir supporté mes choix de vie et pour avoir éclairé chacun de mes retours à la maison.

Merci à mon modèle dans ce monde, ma mère.

Enfin, merci Guillaume pour tout ce que tu m'as apporté.

Table des matières

Remerciements	1
Table des matières	5
Liste des abréviations.....	10
Liste des figures.....	14
Liste des tableaux.....	16
Première partie : Introduction	17
Chapitre I. Le placenta humain	21
A- Le développement du placenta humain	21
1) Développement endométrial préimplantatoire	21
2) Implantation embryonnaire	27
3) Différenciation trophoblastique.....	30
a) Différenciation du cytotrophoblaste villositaire.....	32
b) Différenciation du trophoblaste extravilloux	35
4) Mise en place de la circulation fœto-maternelle.....	36
5) Placenta définitif	39
B- Fonctions du placenta humain.....	41
1) Fonction endocrine	41
a) Hormones stéroïdiennes	41
b) Hormones polypeptidiques	44
2) Fonction d'échanges	52
a) Transport de glucose	52
b) Transport d'acides aminés	53
c) Transport d'acides gras	54

d)	Transport des immunoglobulines G	54
3)	Fonction de respiration	55
4)	Fonction immunitaire.....	56
5)	Fonction de barrière protectrice.....	62
Chapitre II. Contrôle du développement placentaire		66
A-	Invasion trophoblastique	66
1)	Facteurs d'adhésion et d'invasion trophoblastique.....	67
a)	Facteurs d'adhésion : les cadhérines et les intégrines.....	67
b)	Facteurs de l'invasion : les protéases.....	70
2)	Régulation de l'invasion trophoblastique par les facteurs diffusibles.....	75
a)	Les hormones placentaires.....	75
b)	Les facteurs de croissance	77
c)	Les cytokines et interleukines	79
d)	L'human leukocyte antigen G.....	80
3)	Régulation de l'invasion trophoblastique par les facteurs transcriptionnels	81
a)	Les micro-ARN	81
b)	Les facteurs de transcription	83
4)	Les voies de signalisation de l'invasion trophoblastique	85
a)	La voie mitogen-activated protein kinases (MAPK)	86
b)	La voie phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-Akt.....	87
c)	La voie Janus kinase (JAK)-signal transducers and activators of transcription (STAT) ..	87
d)	La voie Wingless (Wnt)/β-caténine	88
e)	La voie Focal Adhesion Molecules (FAK)	90
f)	La voie Smad.....	91
5)	Contrôle de l'invasion trophoblastique par l'endomètre	93
B-	Apoptose trophoblastique	95

1)	La protéine p53	95
2)	La famille B cell lymphoma-2 : Bcl2.....	98
3)	Les caspases	99
4)	L'apoptose	100
5)	Apoptose des cytotrophoblastes	103
6)	Apoptose endométriale	104
7)	Apoptose et grossesses pathologiques.....	106
Chapitre III. Les pathologies de la grossesse		108
A-	Les fausses couches à répétition.....	108
1)	Définition.....	108
2)	Etiologies des FCR.....	109
a)	Les causes chromosomiques embryonnaires.....	109
b)	Les causes utérines.....	110
c)	Les causes endocriniennes	110
d)	Les causes immunitaires.....	111
B-	La pré-éclampsie	112
1)	Définition	112
2)	Etiologies et facteurs de risques de la PE.....	113
3)	Symptômes de la PE	116
4)	Physiopathologie de la PE	117
a)	Dysfonctionnement placentaire	118
b)	Dysfonctionnement endothélial maternel	121
C-	Le retard de croissance intra-utérin (RCIU)	126
1)	Définition.....	126

2)	Etiologie des RCIU	128
a)	Les causes maternelles.....	128
c)	Les causes fœtales.....	130
	Chapitre IV. Le Facteur PréImplantatoire (PIF).....	131
A-	Découverte et caractérisation du PIF	131
1)	Contexte de recherche.....	131
2)	Découverte et caractérisation du PIF.....	132
a)	Le test d'inhibition de rosette	132
b)	Découverte du PIF	132
c)	Purification et caractérisation du PIF	133
3)	Partenaires du PIF	136
B-	Fonctions du Facteur PréImplantatoire.....	138
1)	Le PIF et la fonction immunitaire	138
2)	Le PIF et le neurodéveloppement.....	139
3)	Le PIF et le stress oxydatif	141
C-	PIF et fonctions de reproduction	142
1)	Le PIF et le développement embryonnaire.....	142
2)	Rôles du PIF dans la fonction endométriale	144
a)	Voies de l'immunité.....	144
b)	Voies de l'apoptose	145
c)	Voies de l'adhésion cellulaire.....	145
d)	Voies de la réceptivité utérine	146
3)	Rôles du PIF dans la circulation maternelle	146
	Deuxième Partie : Démarche expérimentale et Résultats.....	151
	Article 1	157

Localisation du Facteur PréImplantatoire au cours de la grossesse humaine et rôle dans l'invasion trophoblastique.....	157
Article 2	163
Analyse globale des gènes régulés par le Facteur PréImplantatoire et effets du PIF sur l'apoptose trophoblastique.....	163
Article 3	169
Le Facteur PréImplantatoire protège de la pré-éclampsie : Il favorise l'invasion trophoblastique et inhibe le stress oxydatif	169
Troisième partie : Discussion et Perspectives	175
I. Le PIF : un nouveau facteur présent à l'interface foëto-maternelle	177
II. Le PIF : un nouveau facteur régulateur de l'implantation embryonnaire.....	181
III. Le PIF : un nouveau biomarqueur de sélection des embryons en F.I.V et du bon déroulement de la grossesse ?.....	188
Bibliographie	191
Annexes	217

Liste des abréviations

Aβ	Peptide amyloïde β
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase
AMP	Assistance médicale à la procréation
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
AMPK	Adénosine monophosphate activated protein kinase
Anti-PIF mAC	Anticorps monoclonal dirigé contre le PIF
AP-2	Activating protein 2
APAF-1	Apoptotic protease activating factor-1
APP	Protéine amyloïde
ARN	Acide ribonucléique
ASCT	Sodium dependent transporters of polar neutral amino acid
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
AVC	Accident vasculaire cérébral
BAG3	BCL2 associated athanogene 3
Bcl2	B cell lymphoma-2
BCOR	BL6 Corepressor
BH	BCL2 Homology
BHE	Barrière hémato-encéphalique
C/EBPβ	CCAT enhancer-binding protein Beta
CGA	Glycoprotein hormones alpha polypeptide
CHIPS	Centre Hospitalier Intercommunal de Poissy-Saint-Germain en Laye
CIVD	Coagulation intravasculaire disséminée
CO₂	Dioxyde de carbone
CT	Cytotrophoblaste
CTEV	Cytotrophoblaste extravilleux
CTV	Cytotrophoblaste villeux
CYP11A1	Cytochrome P450 _{sc} mitochondrial
DAF	Decay accelerating factor
DD	Domaine de mort
Dff40	DNA Fragmentation Factor 40
DHEA	Dehydroepiandrosterone
DHEA-S	Dehydroepiandrosterone sulfaté
DID	Diabète de type I
Dkk1	Dickkopf-related protein
DSCAML1	Down syndrome Cell Adhesion Molecule Like 1
E1	Œstrone
E2	17 β -œstradiol
E3	Œstriol
EG-VEGF	Endocrine gland derived vascular endothelial growth factor
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay

ENDO G	Endonucléase G
EPF	Early pregnancy factor
ERK	Extracellular signal-regulated kinases 1/2
FABP	Fatty acids binding protein
FADD	Fas associated death domain
FAK	Focal adhesion kinase
FAT	Fatty acids translocase
FATP	Fatty acid transporter protein
FC	Fausses couches
FCR	Fausses couches à répétition
FDA	Food and Drug Administration
F.I.V	Fécondation <i>in vitro</i>
Fn-14	Fibroblast growth factor inducible
FOXO1A	Forkhead box O1A
FSH	Hormone folliculo-stimulante
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor
GCM1	Glial cell missing factor 1
GH	Hormone de croissance
GIG	Laboratoire Gamètes-Implantation-Gestation
GLUT	Transporteur de glucose
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor
GnRH	Gonadotrophin-releasing hormone
Grb-2	Growth factor receptor bound protein 2
HBEGF	Heparin-binding EGF-like growth factor
hCG	Hormone chorionique gonadotrope humaine
HELLP	Haemolysis-elevated liver enzymes-low platelets count
HERV	Human endogenous retroviruses
hESC	Cellules stromales endométriales humaines décidualisées
HGF	Hepatocyte growth factor
HIF	Hypoxia inducible factor
HLA	Human leukocyte antigen
HOXA10	Homeobox A10
hPGH	Hormone de croissance placentaire
hPL	Hormone lactogène placentaire
HSD3B1	3 β -hydroxystéroïde dehydrogénase 1
HSP	Heat shock proteins
HTA	Hypertension artérielle
HTR-8/SVneo	Lignée trophoblastique immortalisée (antigène T du virus simien 40)
IAP	Inhibitors of apoptosis proteins
Id	Inhibitor of DNA binding
IDE	Insulin-degrading enzyme
INF	Interféron
IGF	Insulin growth factor
IGFBP1	Insulin-like growth factor-binding protein
IgG	Immunoglobuline G
IL	Interleukine

iNOS	Oxyde nitrique synthase inductible
IRAKBP1	Interleukine 1 associé à la protéine kinase 1
ITG	Intégrine
JAK	Janus kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinases
KIR	Killer cell immunoglobulin-like receptor
Kiss1R	Récepteur des kisspeptines
Kp	Kisspeptine
Kv1.3b	Canal potassique voltage-dépendant
LH	Hormone lutéinisante
LIF	Leukemia inhibitory factor
LPBA	Lymphocyte platelet binding assay
lincRNA	ARN long non codant
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MDM2	Mouse double minute 2 homologue
MCP	Monocyte chemotactic protein
MEC	Matrice extracellulaire
MFIU	Mort fœtale <i>in utero</i>
MFSD2	Major facilitator superfamily domain containing
miRNA	Micro ARN
MLN64	Metastatic lymph node 64 protein
MMP	Métalloprotéase matricielle
MT-MMP	Métalloprotéase matricielle membranaire
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MUC-1	Mucine 1
NES	Séquence d'exportation nucléaire
NLS	Séquence de localisation nucléaire
NK	Natural killer
O₂	Oxygène
PAG	Fœtus petit pour son âge gestationnel
PAPPA	Pappalysine
PAI-1	Plasminogen activators inhibitor
PDI	Protein disulfide isomerase
PE	Pré-éclampsie
Pg	Progestérone
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIBF	Progesterone induced blocking factor
PIF	Facteur PréImplantatoire
PIFs	Facteur PréImplantatoire synthétique
PIGF	Facteur de croissance placentaire
Pin1	Peptidyl-prolyl cis/trans isomerase
PIP2	Phosphatidylinositol-4, 5-bis-phosphate
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PPAR	Peroxisome proliferator activator receptor
PRDX	TRX-dependent peroxide reductase

PRL	Prolactine
PROK	Prokinéticine
RCIU	Retard de croissance intra-utérin
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G
RE	Récepteur aux oestrogènes
RIT	Test d'inhibition de rosette
RO	Récepteur olfactif
ROS	Reactive oxygen species
RP	Récepteur à la progestérone
RTK	Récepteurs à activité tyrosine kinase
SA	Semaine d'aménorrhée
SAPL	Syndrome des anti-phospholipides
SCMH1	Sex Comb on Midleg Homolog-1 protein
sEng	Endogline soluble
sFlt-1	Soluble fms-like tyrosine kinase-1
SG	Semaine de grossesse
SNC	Système nerveux central
SORBS2	Sorbin and SH3 domain contening 2
ST	Syncytiotrophoblaste
STAT	Signal transducer and activator of transcription
STIP1	Stress induced phosphoprotein 1
STOX1	Storkhead box 1
SV-40	Virus simien 40
TCF-4	Transcription factor-4
TGF	Transforming growth factor
Th	Lymphocyte T helper
TIMP	Inhibiteur tissulaire des métalloprotéases
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumour Necrosis Factor
TORCH	Toxoplasmosis, Other (syphilis, varicella-zoster, parvovirus B19), Rubella, Cytomegalovirus (CMV), and Herpes infections
TRX	Thioredoxine oxydase
TSH	Hormone thyroestimuline
TTR	Transthyretin
TWEAK	TNF Weak inducer of apoptosis
uNK	Uterine natural killer
uPA	Urokinase plasminogen activator
UVSQ	Université de Versailles Saint Quentin en Yvelines
V-CAM	Vascular-endothelial cell-adhesion molecule
VEGF	Vascular endothelial growth factor
Wnt	Wingless
ZO-1	Zonula occludens-1

Liste des figures

Figure 1: Schéma de l'utérus humain en vue frontale (à gauche) et coupe histologique en vue transversale (à droite).....	22
Figure 2: Différenciation de l'utérus humain au cours du cycle menstruel.....	27
Figure 3: Les étapes de l'implantation humaine.....	29
Figure 4: Représentation schématique des étapes.....	30
Figure 5: Unité structurale et fonctionnelle du placenta, la villosité chorale.....	31
Figure 6: Représentation des deux voies de différenciation du cytotrophoblaste humain. ...	32
Figure 7: La différenciation du cytotrophoblaste extra-villeux.....	36
Figure 8: Circulation sanguine placentaire définitive.	40
Figure 9: Profil sérique maternel.	51
Figure 10: Les échanges fœto-maternels.....	56
Figure 11: Mise en place de la tolérance maternelle par le trophoblaste.....	60
Figure 12: Voies de différenciation des lymphocytes T CD4+.....	62
Figure 13: Interaction entre les intégrines trophoblastiques et endométriales au cours de la phase d'adhésion.	69
Figure 14: Les acteurs de l'invasion trophoblastique.	74
Figure 15: Les principales voies de signalisation impliquées dans la migration et l'invasion trophoblastique.....	92

Figure 16: Régulation de l'expression et de l'activité de p53.	98
Figure 17: Structure des membres de la famille Bcl2.	99
Figure 18: Les voies principales de l'apoptose.....	102
Figure 19: Etiologies des fausses couches à répétition.....	109
Figure 20: Schéma classique de la physiopathologie de la pré-éclampsie.	118
Figure 21: Altération du remodelage des artères utérines au cours de la PE.	120
Figure 22: Modèle intégré de la physiopathologie de la PE.	125
Figure 23: Exemple de courbe morphométrique néonatale remise à jour pour la population française (filles).	127
Figure 24: Facteurs de risques du retard de croissance intra-utérin.....	130
Figure 25: Structure protéique du Facteur PréImplantatoire.....	135
Figure 26: Liaison entre le PIF et ses partenaires protéiques.....	137
Figure 27: Schéma expérimental des effets <i>in vivo</i> du PIFs sur le neuroprotection.	140
Figure 28: Schéma expérimental des effets <i>in vitro</i> du PIFs sur le développement embryonnaire.....	143
Figure 29: Schéma bilan des résultats.....	177
Figure 30: Perspectives d'études <i>in vitro</i>	185

Liste des tableaux

Tableau 1: Récapitulatif de la production hormonale placentaire humaine.....	51
Tableau 2: Principaux agents pathogènes capables d’infecter au cours de la grossesse.....	63
Tableau 3: Classification, nomenclature et substrats des métalloprotéases.	72
Tableau 4: Gènes cibles et fonctions des mi-ARN dans les cellules trophoblastiques humaines.....	82
Tableau 5: Régulateurs de l’invasion et voies de signalisation associées.....	92
Tableau 6: Facteurs de risques génétiques d’origine maternelle impliqués dans la PE.....	115
Tableau 7: Symptômes et complications associés à la pré-éclampsie.....	117
Tableau 8: Facteurs d’origines placentaires impliqués dans les lésions endothéliales maternelles.....	122

Première partie :

Introduction

Le terme de placenta dérive du latin **placenta, -ae** qui signifie « galette, gâteau » en référence à sa forme définitive après neuf mois de développement. De manière plus explicite, le placenta est qualifié en allemand de **mutterkuchen** qui se traduit par « gâteau de la mère ».

Organe éphémère, aux fonctions multiples et indispensables à la gestation, le placenta se développe tout au long de la grossesse tel un « jumeau du fœtus » et revêt une importance particulière d'un point de vue scientifique mais aussi symbolique.

Sacralisé dans certaines sociétés, le placenta fait l'objet de différents rituels en hommage à sa fonction protectrice du fœtus au cours de la gestation. Il est inhumé sous un arbre particulier qui deviendra un lieu de recueillement pour la famille à Bali et dans certaines zones d'Afrique de l'Ouest. Il est incinéré afin d'éviter qu'un mauvais esprit ne s'en prenne au bébé en Amérique latine ou détaché du nouveau-né plusieurs heures après l'accouchement au Cambodge pour une séparation en douceur. Ce double génétique du bébé est un organe fascinant qui nous permet à nous, scientifiques, de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la mise en place de la gestation.

Comprendre les étapes impliquées dans le développement précoce du placenta humain permettrait de mieux appréhender l'apparition de pathologies de la grossesse associées à des défauts de la placentation et aux conséquences parfois gravissimes pour la mère mais aussi pour le futur nouveau-né.

Chapitre I. Le placenta humain

A- Le développement du placenta humain

Le succès de l'implantation et de la placentation est le résultat d'une bonne communication et d'une synchronisation entre le blastocyste issu de la fécondation, qui est apte à s'implanter, et l'endomètre maternel qui est qualifié de réceptif. La mise en place d'un placenta fonctionnel, qui servira d'interface entre la mère et l'embryon et qui subviendra aux besoins du fœtus tout au long de la gestation, est un prérequis au bon déroulement d'une grossesse.

1) Développement endométrial préimplantatoire

Le **développement préimplantatoire** fait référence à la période située entre la fécondation et la mise en place des premiers contacts cellulaires entre le blastocyste et l'endomètre. Au cours de cette période, qui dure 7 jours dans l'espèce humaine, l'endomètre et l'embryon acquièrent des propriétés qui seront indispensables à une bonne synchronisation entre ces deux acteurs de l'implantation embryonnaire.

Il a été démontré que l'embryon est capable de s'implanter de manière ectopique dans n'importe quel tissu de l'organisme. En revanche, l'endomètre est le seul tissu dans lequel l'embryon ne peut s'implanter qu'au cours d'une période précise du cycle utérin appelée **la fenêtre implantatoire** (Psychoyos, 1973). Cette période estimée entre le 20^{ème} et le 24^{ème} jour du cycle menstruel (pour un cycle modèle de 28 jours chez la femme) correspond à une

phase de **réceptivité maximale de l'endomètre**. La mise en place de cette fenêtre implantatoire résulte de modifications biochimiques et morphologiques de l'endomètre qui se déroulent tout au long du cycle menstruel.

L'endomètre est un organe dynamique qui se différencie et se régénère de manière cyclique sous l'action des hormones stéroïdes, l'**œstradiol** et la **progestérone**. Il se compose d'un épithélium prismatique stratifié (couche fonctionnelle) qui repose sur une couche stromale contenant les glandes utérines (couche basale). Cette couche cellulaire recouvre la partie musculaire de l'utérus que l'on appelle le **myomètre**. La couche la plus externe est une séreuse que l'on appelle le **péritoine**. (Figure 1)

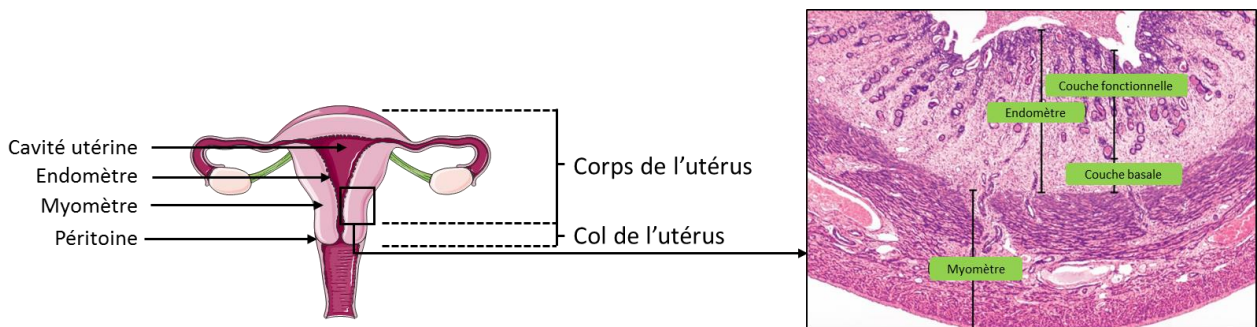


Figure 1: Schéma de l'utérus humain en vue frontale (à gauche) et coupe histologique en vue transversale (à droite).

L'utérus humain est composé de trois tuniques qui s'organisent concentriquement. En contact avec la lumière de la cavité utérine se trouve une muqueuse, l'endomètre, qui repose sur une couche musculuse, le myomètre. La couche la plus externe est une couche séreuse appelée le péritoine. L'endomètre est formé d'un épithélium prismatique, unistratifié. Il comporte trois types cellulaires, des cellules sécrétrices, des cellules ciliées et des cellules basales. On distingue une couche fonctionnelle et une couche basale dans l'endomètre. La couche fonctionnelle subit d'importants changements morphologiques tout au long du cycle cellulaire et se régénère grâce à la couche basale à l'issue des menstruations.

On distingue deux phases dans la différenciation de l'endomètre, une phase proliférative et une phase sécrétoire. La **phase proliférative** s'étend du 4^{ème} jour au 14^{ème} jour du cycle menstruel chez la femme. Elle se caractérise par un développement de la couche épithéliale

luminale de l'endomètre, associé à une augmentation de la prolifération cellulaire. Cette croissance des cellules épithéliales et stromales est induite par l'augmentation des taux de 17β -œstradiol (E2). Le pic d'E2 stimule l'expression des récepteurs nucléaires spécifiques des œstrogènes (RE) et de la progestérone (RP). Il a été montré récemment que sous l'action de l'E2, les facteurs de transcription **CCAT Enhancer-Binding Protein Beta** (C/EBP β) et **Homeobox A10** (HOXA10) favorisent la prolifération des cellules stromales. L'augmentation progressive de l'expression des RE et RP durant cette période, permet ainsi la mise en place de la seconde phase de différenciation de l'endomètre.

La phase sécrétoire précédée par l'ovulation s'étend du 14^{ème} au 28^{ème} jour, elle est essentiellement sous le contrôle de la progestérone (Pg). L'augmentation de la concentration circulante de Pg diminue l'action des œstrogènes i) en inhibant l'expression des RE et ii) en convertissant l'E2 en œstrone (E1), qui a une très faible affinité pour les RE. Ceci se traduit par une inhibition significative de la prolifération des cellules épithéliales à la faveur d'une différenciation des cellules stromales. Ces changements aboutissent au phénomène de **décidualisation**. Au cours de cette phase, les glandes utérines de forme allongée pendant la phase proliférative deviennent tortueuses. Les cellules glandulaires acquièrent, au 17^{ème} jour du cycle, des vacuoles sous-nucléaires chargées de glycogène. Deux jours plus tard, les glandes présentent une **activité sécrétoire abondante** de type apocrine. En effet, cette sécrétion est induite par le détachement du pôle apical des cellules glandulaires sous la pression des vacuoles qui déversent ainsi leur contenu en glycogène. L'activité sécrétoire de l'endomètre est maximale au 21^{ème} jour du cycle (Singh et al., 2011). La décidualisation est également associée à une néo-angiogenèse et à un remodelage drastique du système vasculaire endométrial. Les artères endométriales spiralées présentent

un calibre plus large afin d'augmenter le débit sanguin tout en réduisant la pression (Whitley and Cartwright, 2010). Cette différenciation permet d'augmenter les capacités d'échanges entre l'organisme maternel et le potentiel futur embryon. Au 20^{ème} jour du cycle, sous l'action de la Pg, les cellules stromales jusque-là de type fibroblastique, subissent une réorganisation de leur cytosquelette, deviennent polygonales et acquièrent un phénotype décidal (Ihnatovych et al., 2007). Au cours de cette différenciation morphologique, le répertoire d'expression des intégrines à la surface des cellules stromales est modifié. Les intégrines sont des molécules de surface impliquées dans les contacts cellules-cellules ou cellules-matrice extracellulaire (MEC). Ce sont des protéines hétérodimériques composées d'une chaîne α et d'une chaîne β qui existent sous différentes formes et qui servent de récepteurs à différents ligands de la MEC. Une augmentation de l'expression des intégrines (ITG) $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha 1\beta 1$, qui lient respectivement la laminine, la fibronectine, la vitronectine et les collagènes de type I et IV, a été observée au cours de la décidualisation (Hwang et al., 2002). Parallèlement à ces changements morphologiques, les cellules déciduales subissent une différenciation biochimique. Elles sécrètent de grandes quantités d'hormones et de cytokines telles que la **prolactine** (PRL), l'**insulin-like growth factor-binding protein** (IGFBP), le **facteur tissulaire** (Facteur III), l'**interleukine 1** (IL1), l'**interleukine 11** (IL11) et l'**interleukine 15** (IL15) (Saleh et al., 2011; Dunn et al., 2003). Ces facteurs sécrétés par les glandes endométriales permettent de contrôler l'ancrage du placenta dans la décidue. De plus, ils permettent le recrutement et la différenciation de cellules immunitaires telles que les Natural Killer utérines (uNK) qui sont indispensables à la mise en place de l'immunotolérance. Différents facteurs de transcription tels que les facteurs **CCAT Enhancer-Binding Protein Beta** (C/EBP β), **Homeobox A10** (HOXA10) ou **Forkhead Box O1A**

(FOXO1A) sont surexprimés durant la phase sécrétoire et favorisent en particulier l'expression de la PRL et de l'IGFBP (Gellersen and Brosens, 2014; Takano et al., 2007). Sous l'influence de la Pg, différents facteurs de transcription tels que C/EBP β , HOXA10, FOXO1A, et Dkk1 (Dickkopf-related protein 1) favorisent la différenciation des cellules stromales. De plus, la voie Wnt/ β -Catenin joue un rôle crucial dans la différenciation des cellules stromales (Bhurke et al., 2016; Zhu et al., 2014).

Au cours de la phase sécrétoire, l'endomètre acquiert **transitoirement un phénotype réceptif**. Au cours de cette brève période, appelée la **fenêtre d'implantation**, l'endomètre sécrète des facteurs et exprime des ligands ou des récepteurs qui facilitent l'implantation de l'embryon. La réceptivité utérine est associée à l'apparition de protrusions membranaires au pôle apical de l'épithélium endométrial, appelés **pinopodes**, entre le 20^{ème} et le 21^{ème} jours du cycle menstruel. Initialement décrit chez la souris puis dans l'endomètre sécrétoire humain, le rôle précis de ces structures qui sont dépendantes de la Pg, reste à déterminer. Il semble que les pinopodes facilitent l'adhésion du blastocyste en le guidant spatialement vers le site d'implantation (Lessey, 2000; Quinn and Casper, 2009). Parmi les cytokines et les facteurs de croissance présents dans l'endomètre figure le **leukaemia inhibitory factor (LIF)**, une glycoprotéine pléiotrope sécrétée par l'endomètre uniquement au cours de la phase sécrétoire. Elle est exprimée dans les épithéliums glandulaires et luminaux (Cullinan et al., 1996). L'**interleukine 1 (IL1)** est un polypeptide exprimé majoritairement au cours de la phase sécrétoire et qui semble être nécessaire à l'implantation embryonnaire. Première cytokine activée à l'interface foëto-maternelle, elle régule l'expression d'autres cytokines, les interactions entre l'embryon et l'endomètre ainsi que l'apoptose endométriale durant l'implantation (Huang et al., 2001; Simón et al., 1997). La **mucine 1 (MUC-1)** est une protéine

d'adhésion glycosylée dont l'expression varie au cours du cycle utérin et dont la présence à l'épithélium endométrial semble être associée à un effet négatif sur l'implantation. Elle est présente uniquement à la surface des cellules ciliées de la couche épithéliale et elle n'est jamais retrouvée sur les cellules non ciliées ou les pinopodes. Au cours de la fenêtre d'implantation, MUC-1 est inhibée principalement par la progestérone mais aussi par son clivage par le trophoblaste, *via* la sécrétion de protéases telles que les métalloprotéases (MMP) 17 et 14, afin de permettre son adhésion à l'endomètre (Diedrich et al., 2007; Achache and Revel, 2006). Plus récemment, des études transcriptomiques et des dosages multiplex ont mis en évidence de nouveaux marqueurs potentiels de types cytokiniques qui témoignent d'une **adaptation de l'environnement inflammatoire et immunitaire endométriale** au cours de la fenêtre implantatoire. Parmi ces molécules, on note le **granulocyte colony stimulating factor (G-CSF)**, l'**IL15**, qui favorisent le recrutement et la maturation des uNK et l'**IL18** qui participe à l'angiogenèse. Le TNF Weak inducer of apoptosis (**TWEAK**) et son récepteur fibroblast growth factor inductible (**Fn-14**) exercent des effets protecteurs contre les effets délétères d'un environnement pro-inflammatoire dans l'endomètre (Lédée et al., 2016, 2013, 2011). L'**ostéopontine**, une molécule à séquence GRGDS (Gly-Arg-Gly-Asp-Ser) potentiellement impliquée dans la création de pontage entre le trophoctoderme et l'endomètre, a également été associée à la réceptivité utérine (Apparao et al., 2001).

A l'issue de la période préimplantatoire, l'endomètre est réceptif à un embryon qui, depuis la fécondation, aura acquis la capacité de s'implanter (Figure 2).

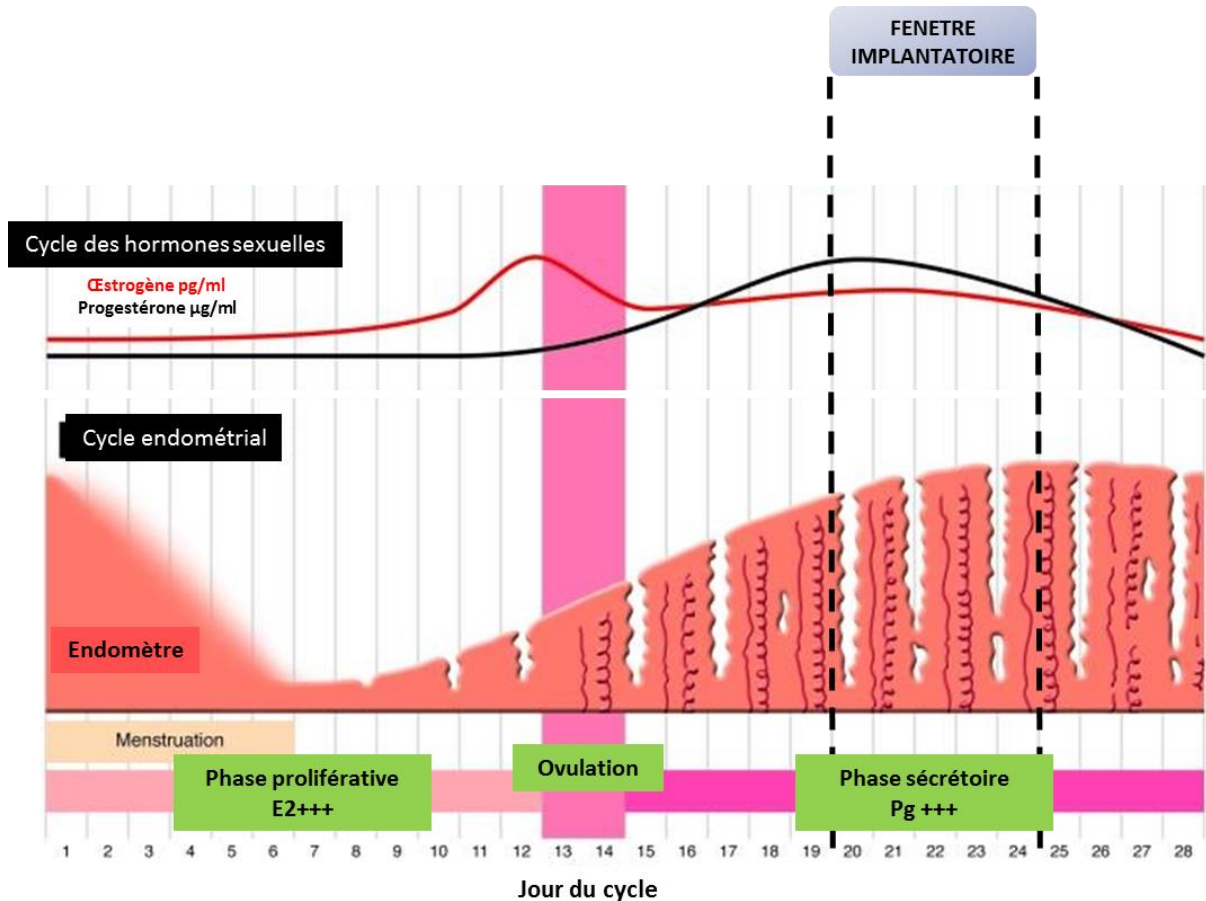


Figure 2: Différenciation de l'utérus humain au cours du cycle menstruel.

Modifié d'après Aitken et al ; 2008. L'endomètre humain se différencie au cours du cycle menstruel afin de se préparer à une éventuelle grossesse. Cette différenciation morphologique et fonctionnelle de l'épithélium et de la couche stromale de l'endomètre est sous la dépendance des hormones stéroïdes (E2 et Pg.) La décidualisation de l'endomètre a lieu au cours de la phase sécrétoire et permet la mise en place d'une fenêtr de réceptivité. L'embryon humain s'implante dans l'endomètre uniquement au cours de cette période précise.

2) Implantation embryonnaire

Dans les premiers jours suivant la fécondation, le développement de l'embryon est totalement dépendant du stockage en protéines, ARN messagers et métabolites issus de l'ovocyte. Six jours après la conception, le blastocyste arrive dans la cavité utérine après avoir remonté les trompes et assuré les premières étapes de son développement. Une fois dans la cavité, l'embryon qui est au stade de blastocyste ne peut plus subvenir à ses besoins

énergétiques et métaboliques. Le processus d'implantation nécessaire à sa survie débute alors.

A ce stade, le blastocyste, recouvert par la zone pellucide, est constitué d'une assise de cellules externes appelée le **trophectoderme** qui donnera naissance aux annexes embryonnaires telles que le placenta, l'amnios et le chorion. Les cellules internes du blastocyste s'agglutinent à un pôle et forment la **masse cellulaire interne** qui formera le futur embryon. Le reste du blastocyste est occupé par une cavité, le **blastocèle**. Une fois dans la cavité utérine, la zone pellucide du blastocyste se rompt sous l'action de protéases sécrétées par l'embryon. Cette étape est qualifiée d'**éclosion**. Le blastocyste polarisé s'oriente alors et s'**appose** à l'endomètre par son assise cellulaire externe à découvert, suite à l'éclosion. Cette couche cellulaire, appelée le trophoblaste, participera à la formation du placenta. Sept à huit jours après la fécondation, des contacts étroits s'établissent entre les cellules trophoblastiques situées au pôle embryonnaire et l'épithélium utérin, on parle alors d'**adhésion**. En parallèle, les cellules trophoblastiques qui entourent le blastocyste se différencient en deux populations cellulaires. La couche interne, constituée de cellules mononucléées, est appelée le **cytotrophoblaste** (CT) et la couche externe, constituée de cellules plurinucléées, constitue le **syncytiotrophoblaste** (ST). La dernière étape de l'implantation embryonnaire dans l'espèce humaine fait intervenir un processus d'**invasion profonde** du trophoblaste dans l'endomètre maternel, induite par l'activité protéolytique du ST (Figure 3). Au 9ème jour après la fécondation, le trophoblaste est complètement recouvert par la muqueuse utérine au niveau du site d'implantation.

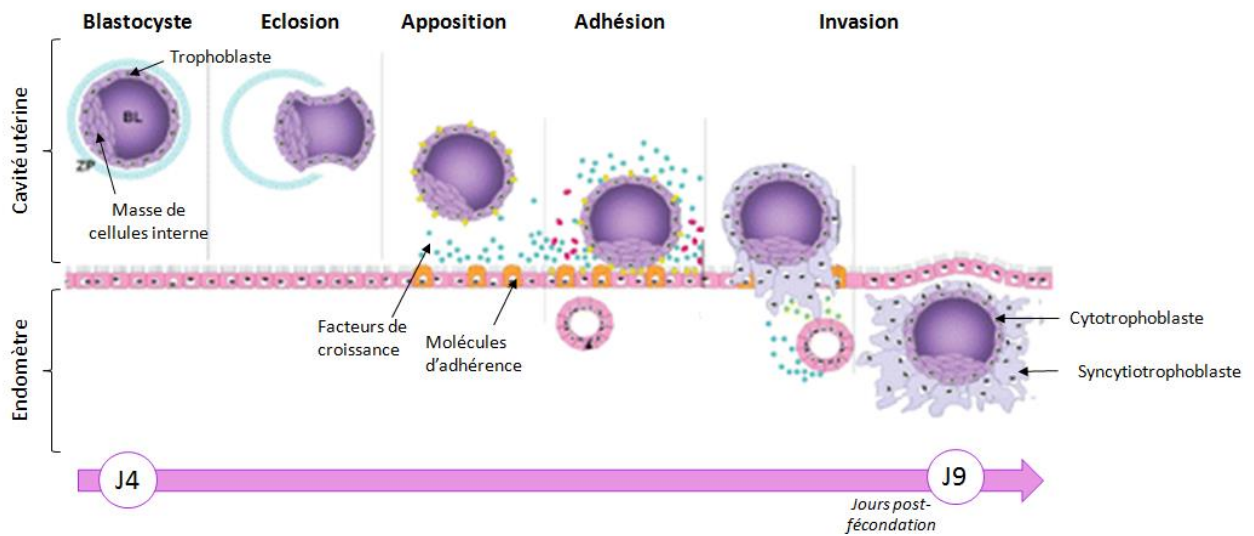


Figure 3: Les étapes de l'implantation humaine.

Modifié d'après Fitzgerald et al, 2008. L'implantation humaine est caractérisée par la succession de quatre phases : Les phases d'éclosion, d'apposition, d'adhésion et d'invasion. L'endomètre réceptif exprime des molécules d'adhérence et des facteurs de croissance qui permettent l'implantation embryonnaire. L'invasion du trophoblaste dans l'endomètre est induite par le syncytiotrophoblaste.

Ces premières étapes du développement placentaire aboutissent au **stade prélacunaire** du développement placentaire (Figure 4A-B). Vers le 8ème jour qui suit la fécondation, des vacuoles apparaissent dans la masse syncytiale. Ces vacuoles progressent, forment des lacunes entre les travées syncytiales, constituant un espace qui deviendra la **chambre intervillieuse**. Il s'agit du **stade lacunaire** (Figure 4C). Au 13ème jour, le cytotrophoblaste qui est encore limité à une assise interne envahit les travées de syncytium formant ainsi les villosités chorales primaires (Figure 4D). Après deux semaines, ces villosités primaires sont envahies par le mésenchyme embryonnaire et constituent les villosités secondaires (Figure 4E). Enfin, des capillaires foetaux apparaissent dans l'axe mésenchymateux. Cette vascularisation caractérise la formation de la villosité tertiaire (Figure 4F). En parallèle, le réseau vasculaire foetal de l'allantoïde atteint la plaque chorale et se connecte aux vaisseaux des troncs villositaires.

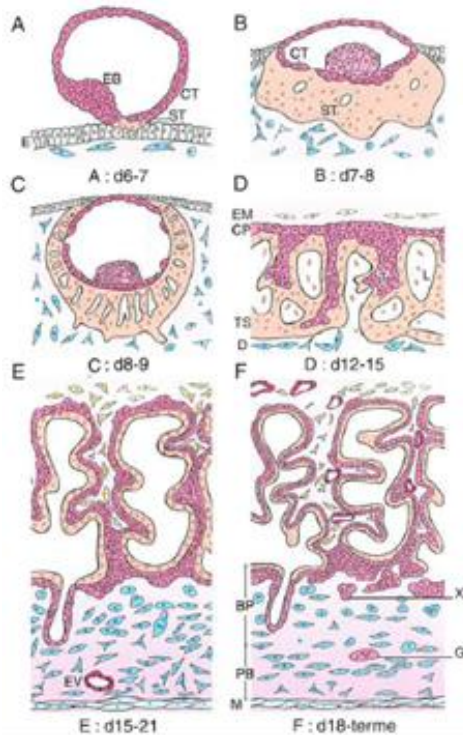


Figure 4: Représentation schématique des étapes du développement placentaire humain.

D'après Evain-Brion, 2001. A et B) Stade prélacunaire. C) Stade lacunaire. D) Stade villeux et villosités primaires. E) Stade villeux et villosités secondaires. F) Stade villeux et villosités tertiaires. BP: Plaque basale, CP: Plaque chorale, CT: Cytotrophoblaste, D: Décidue, E: Epithélium endométtrial, EB: Bouton embryonnaire, EM: Mésoderme embryonnaire, EV: Vaisseau endométtrial, G: Cellules géantes, J: Zone jonctionnelle, L: Lacunes de sang maternel, PB: Lit placentaire, ST: Syncytiotrophoblaste, T: Villosité primaire, TS: Coque cytotrophoblastique.

3) Différenciation trophoblastique

La villosité chorale constitue l'unité structurale et fonctionnelle du placenta humain. Elle apparaît sous sa forme définitive trois semaines après la fécondation. La villosité chorale est délimitée par une double assise de cellules épithéliales, le **cytotrophoblaste villeux (CTV)** mononucléé et le syncytiotrophoblaste multinucléé, qui entoure un axe mésenchymateux contenant des vaisseaux foetaux et des cellules immunitaires macrophagiques appelées cellules de Hofbauer (Philippe Merviel, J.C. Challier, 2001). La villosité peut être ancrée dans l'utérus maternel, elle est appelée **villosité crampon**. Elle peut également flotter dans la chambre intervillieuse (espace qui dérive des lacunes intervillositaires). On l'appelle alors **villosité flottante** (Figure 5).

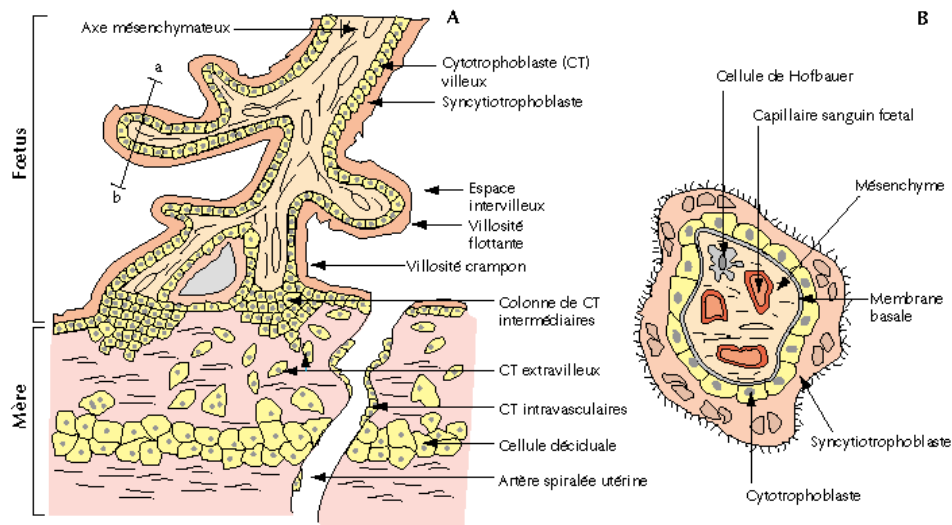


Figure 5: Unité structurale et fonctionnelle du placenta, la villosité chorale.

D'après Evain-Brion 2011. A. Schéma de la villosité chorale en coupe longitudinale. CT. Cytotrophoblaste. B. Schéma de la villosité en coupe transversale selon l'axe a-b indiqué dans le panneau A.

Après la phase initiale de la nidation, la cellule trophoblastique constituant essentiel des villosités placentaires, se différencie selon deux voies distinctes. D'une part, la voie qui conduit aux **cytotrophoblastes villositaires** (CTV) et d'autre part, la voie qui conduit aux **cytotrophoblastes extravilloux** (CTEV) (Handsuh et al., 2007). La villosité chorale est recouverte d'une couche interne de cellules épithéliales mononucléées, les CTV qui reposent sur une membrane basale. Les CTV se différencient en fusionnant entre eux. Cette fusion aboutit à la création d'un syncytium multinucléé qui constitue la couche cellulaire externe de la villosité chorale et que l'on appelle le syncytiotrophoblaste (ST).

Entre 4 et 6 semaines de grossesse, le ST perd ses capacités invasives au profit des CTEV qui se différencient en trois sous-types cellulaires. Les CTEV présents à la base des villosités crampons acquièrent des propriétés invasives (**CTEV invasif**). Ces CTEV invasifs peuvent se différencier en **CTEV endovasculaires** au cours d'une migration orientée vers les artères

spirales maternelles. Les CTEV peuvent également se différencier en **cellules géantes** au cours d'une migration contrôlée dans la décidue (Figure 6).

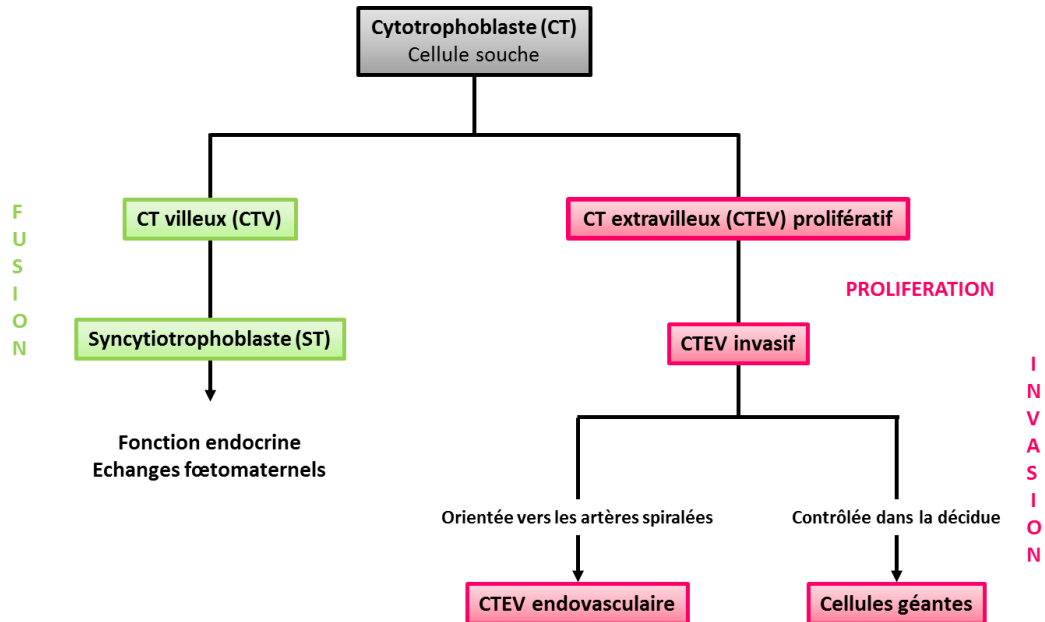


Figure 6: Représentation des deux voies de différenciation du cytotrophoblaste humain.

Le cytotrophoblaste villositaire (CTV) fusionne et forme le syncytiotrophoblaste (ST). Le cytotrophoblaste extravilloux (CTEV) prolifère devient invasif et migre dans la décidue et le myomètre. Il colonise les artères spiralées maternelles (CTEV endovasculaire) ou se différencie en cellules géantes plurinucléées dans l'endomètre maternel.

a) Différenciation du cytotrophoblaste villositaire

Après une phase de prolifération intense au 1^{er} trimestre, les CTV se différencient en ST. La différenciation des CTV s'accompagne de modifications morphologiques (fusion cellulaire) et de modifications biochimiques (synthèse d'hormones) qui peuvent servir de marqueurs de la fusion trophoblastique *in vitro* lors d'expérimentations en laboratoire.

La **différenciation morphologique** des CTV se manifeste par leur capacité à s'agréger puis à fusionner et enfin à créer un syncytium. Les mécanismes moléculaires permettant la fusion des CTV sont encore mal connus mais certaines protéines membranaires impliquées dans ce

processus ont été mises en évidence. Parmi elles, des protéines membranaires appelées **syncytines** ou des protéines de jonction telles que la **connexine 43** et la protéine **zonula occludens-1** (ZO-1) jouent un rôle fondamental dans la syncytialisation. Les **syncytines** sont des protéines d'origine rétrovirale. **Aujourd'hui, on estime que 8 % du génome humain provient de rétrovirus.** Ces fragments d'ADN étrangers sont appelés **HERV** pour human endogenous retroviruses. Chez l'Homme, 18 gènes codant pour des protéines d'enveloppe dérivent de ces HERV. Parmi ces protéines se trouvent les syncytines 1 et 2. Ces syncytines semblent provenir de transferts de gènes horizontaux datant de 10 à 35 millions d'années. Ce sont des glycoprotéines fusogéniques rétrovirales qui ont été capturées ancestralement pour la fonction de placentation. Ces syncytines sont caractérisées par i) une expression spécifiquement placentaire, ii) une faculté à induire la fusion cellulaire, iii) une très forte conservation au sein des mammifères et iv) une propriété immunosuppressive, favorisant ainsi la tolérance immunitaire maternelle au cours de la gestation (Mangeny et al., 2007). Chez les souris, les syncytines A et B partagent des fonctions communes avec leurs homologues humains. Plusieurs travaux réalisés avec des modèles de souris, dont les gènes codant pour les syncytines A et B ont été invalidés, montrent clairement le rôle essentiel des syncytines dans la fusion trophoblastique. Ces invalidations induisent des défauts sévères de la fusion cellulaire, des capacités d'échanges diminuées et une augmentation de la mortalité embryonnaire (Dupressoir et al., 2011, 2009). De plus, des invalidations par ARN interférents des syncytines 1 et 2 dans des cultures primaires de CTV humains ont abouti à une inhibition de la fusion cellulaire confirmant ainsi les résultats obtenus avec le modèle murin (Frendo et al., 2003). Afin d'induire la fusion cellulaire, les syncytines se lient à des récepteurs membranaires également exprimés à la surface des CTV. Plusieurs récepteurs ont été

décrits, les transporteurs **ASCT1 ou ASCT2** (sodium-dependent transporters of polar neutral amino acid 1 et 2) pour la syncytine 1 et **MFSD2** (Major Facilitator Superfamily Domain Containing) pour la syncytine 2.

Parallèlement aux rôles des syncytines, une régulation des jonctions cellulaires est indispensable à la fusion trophoblastique. Les **cadhérines E et 11**, qui sont des protéines d'adhésion impliquées dans la formation de jonctions adhérentes, sont nécessaires à la formation du ST. En effet, l'inactivation de la cadhérine E à l'aide d'un anticorps spécifique induit un défaut de l'agrégation des CTV. En revanche, l'inhibition de l'expression de la cadhérine 11 par des ARN interférents n'induit pas de blocage de l'agrégation cellulaire mais de la fusion des cellules. Ces observations suggèrent que la cadhérine E est nécessaire à l'agrégation et que la cadhérine 11 est nécessaire à la fusion cellulaire des CTV (Getsios and MacCalman, 2003).

La **différenciation biochimique des CTV** en ST se manifeste par la sécrétion dans la circulation maternelle d'hormones stéroïdiennes et polypeptidiques. Parmi ces dernières figure **l'hormone chorionique gonadotrope humaine** (β -hCG). La β -hCG est le premier signal trophoblastique détectable dans la circulation maternelle, elle est utilisée pour le diagnostic de la grossesse. Nous reviendrons en détail sur cette molécule dans le chapitre dédié à la fonction endocrine du placenta.

Le ST, en contact direct avec le sang maternel, est responsable des fonctions endocrines, d'échanges, d'hémostase et de protection du placenta. Le ST présente à sa surface un tapis de microvillosités qui favorise les échanges entre le sang maternel et le sang fœtal. On estime la surface d'échange du ST à environ 14m². Le renouvellement du ST qui ne prolifère pas est assuré par les CTV sous-jacents qui servent de « cellules souches » au ST.

L'élimination des noyaux apoptotiques du ST passe par la formation de fragments syncytiaux appelés **knots**. Ces fragments syncytiaux sont dégradés par les macrophages. Les knots conduisent au relargage dans la circulation maternelle d'ADN foetal, précieux dans l'élaboration de tests de dépistage non invasifs du futur nouveau-né.

b) Différenciation du trophoblaste extravilleux

Les CTEV sont les cellules qui contrôlent l'ancrage du placenta à l'endomètre maternel. Les CTEV présentant des capacités de prolifération sont appelés **CTEV prolifératifs**. Ils sont regroupés en colonne à la base des villosités crampons. Certains d'entre-eux perdent leur phénotype prolifératif et acquièrent un phénotype invasif en migrant vers la partie distale de la colonne. On les qualifie alors de **CTEV invasifs**. Ces CTEV invasifs sont capables de coloniser l'endomètre et le myomètre superficiel en interagissant avec des cellules déciduales et immunitaires. Cette **invasion interstitielle** aboutit à la fusion des CTEV et à leur différenciation en **cellules géantes** bi-trinucléées. Le rôle des cellules géantes n'est toujours pas clairement établi. Une autre partie des CTEV prolifératifs conserve leur capacité de prolifération et sert de cellules « stock » pour le contrôle du processus d'invasion trophoblastique. Les CTEV invasifs migrent de manière spécifique vers les artères utérines spiralées. Ils sont appelés **CTEV endovasculaires** (Figure 7). Les mécanismes contrôlant l'invasion trophoblastique seront développés dans le chapitre II-A.

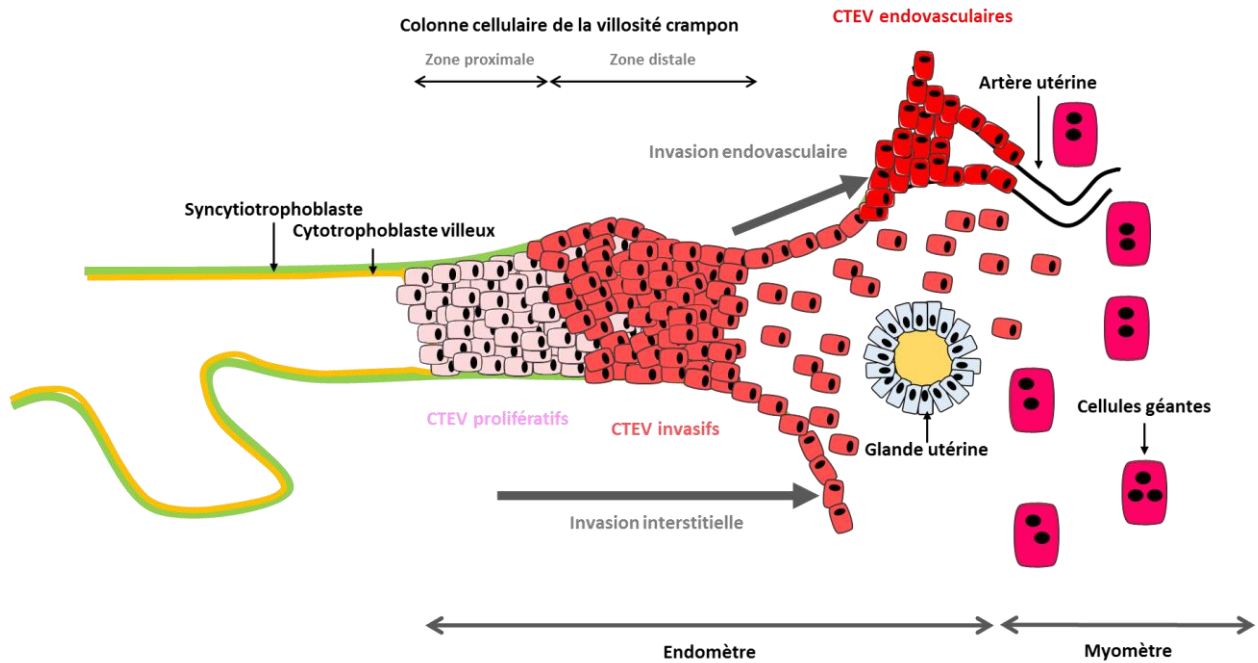


Figure 7: La différenciation du cytotrophoblaste extra-villeux.

Les CTEV se différencient en CTEV invasifs qui migrent vers l'endomètre et jusqu'au 1^{er} tiers supérieur du myomètre (invasion interstitielle). Ce processus permet l'ancrage du placenta dans l'endomètre maternel. Les CTEV migrent également vers les artères utérines spiralées pour participer à leur remodelage. Ce processus est qualifié d'invasion endovasculaire.

4) Mise en place de la circulation fœto-maternelle

Il existe une adaptation dynamique du développement placentaire tout au long de la grossesse afin de subvenir aux besoins croissants du fœtus. A la fin de la grossesse, le réseau vasculaire placentaire a une longueur de plus de 550 km. Le débit sanguin utéroplacentaire passe de 60 ml/min en début de grossesse à 800 ml/min en fin de grossesse. Cette évolution est permise d'une part, par une **augmentation du débit cardiaque maternel** et d'autre part, par le **remodelage des artères utérines**. Dans le placenta, on distingue la circulation maternelle et la circulation fœtale qui restent séparées jusqu'à la délivrance. **Côté maternel**, le réseau vasculaire endométtrial subit des modifications majeures essentiellement dans les artères spiralées. Ces modifications font intervenir trois phases, i) une étape indépendante

de l'invasion trophoblastique, ii) une étape de remodelage vasculaire lié à une invasion périvasculaire des CTEV et enfin iii) une étape associée à l'infiltration des vaisseaux maternels par les CTEV. La première étape a lieu très précocement dans la grossesse [5 semaines d'aménorrhées (SA)] et fait intervenir une désorganisation généralisée des artères maternelles. Cette étape semble être due à l'activation du système rénine-angiotensine décidual et/ou à des facteurs circulants maternels tels que le **vascular endothelial growth factor A** (VEGF-A), le **facteur de croissance placentaire** (PlGF), ou l'hCG. Le remodelage du 1^{er} tiers supérieur des vaisseaux est dépendant de l'invasion trophoblastique par les CTEV endovasculaires. Une invasion périvasculaire aboutit au remplacement des cellules endothéliales utérines maternelles par des CTEV. Ainsi, la tunique élastique artérielle devient une paroi fibreuse et atone, insensible aux molécules vasoactives. De plus, une invasion endovasculaire par les CTEV conduit à l'apparition de bouchons trophoblastiques obstruant la lumière des artères utérines (Pijnenborg et al., 2006; Kaufmann et al., 2003). L'obstruction des artères spiralées conduit le placenta à se développer en situation anaérobie (pO_2 à 20mmHg à 8 SA) durant le 1^{er} trimestre de la grossesse. L'hypoxie joue un rôle central dans le développement placentaire au cours du 1^{er} trimestre de la grossesse. Cette hypoxie exerce d'une part un effet protecteur sur le placenta qui ne possède pas encore l'équipement enzymatique protecteur des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Burton and Jauniaux, 2004; Jauniaux et al., 2000a). D'autre part, l'hypoxie favorise la prolifération des CTEV et inhibe leur différenciation précoce vers un phénotype invasif. Les CTEV prolifératifs se développent à la base de la villosité chorale où la concentration en oxygène est minimale. En revanche, les CTEV invasifs se différencient et migrent de manière orientée vers les zones où la tension en oxygène est maximale (décidue et artères utérines).

Dans le placenta humain, les effets de la tension en oxygène passent principalement par le facteur de transcription Hypoxia Inducible Factor 1 (HIF-1). L'expression placentaire d'HIF-1 est maximale dans le placenta de 1^{er} trimestre précoce et présente un pic d'expression entre 7-9 SG. Son expression diminue drastiquement entre 10-12 SG lorsque la circulation placentaire se met en route et que la pression en oxygène augmente dans la chambre intervillieuse. HIF-1 régule ainsi l'expression transcriptionnelle de facteurs nécessaires au développement placentaire tels que le TGF β 3, le VEGF, GLUT-1 ou la leptine (Caniggia et al., 2000; Semenza, 2000; Hayashi et al., 2004; Grosfeld et al., 2002). Au cours de ce premier trimestre de grossesse, la chambre intervillieuse est perfusée par un ultrafiltrat plasmatique obtenu par percolation du sang maternel à travers les bouchons trophoblastiques. A partir de 9-10 SA, les bouchons trophoblastiques disparaissent progressivement. Le sang maternel artériel entre dans la chambre intervillieuse et la pO₂ atteint 55 mmHg à 12 SA (Jauniaux et al., 2000b). Pour la première fois, le sang maternel est en contact direct avec le ST. Pour cette raison on qualifie le placenta humain de placenta de type **hémochorial**. Cette classification prend en compte la distance interhémale qui correspond au nombre de couches cellulaires séparant la circulation maternelle de la circulation fœtale. La placentation hémomonochoriale qui est spécifique de l'espèce humaine est associée au plus haut degré d'invasion trophoblastique observée lors d'une placentation.

La mise en place de la **circulation fœtale** est dépendante d'une néo-vasculogénèse et d'une néo-angiogénèse actives pendant le 1^{er} trimestre de grossesse. Les premiers signes de vasculogénèse apparaissent 20 jours après la fécondation. Les vaisseaux fœtaux apparaissent grâce à la différenciation *in situ* des précurseurs des cellules endothéliales (hémangioblastes) présents dans le mésenchyme des villosités. Cette différenciation est

induite par le VEGF-A synthétisé par les trophoblastes. Ce facteur est aussi connu pour son rôle pro-prolifératif des cellules endothéliales. D'autres facteurs pro-différenciants des hémangioblastes ont été mis en évidence, notamment le PlGF ou l'**angiopoïétine**. Il est intéressant de noter que l'expression de ces facteurs angiogéniques est modulée par les concentrations locales en oxygène (Burton, 2009). Au 23^{ème} jour de la grossesse, la circulation fœtale est établie, les premiers battements cardiaques de l'embryon peuvent alors se faire entendre.

Au début du 2nd trimestre de la grossesse, le sang maternel traverse le myomètre *via* les artères utéroplacentaires remodelées au cours de l'invasion trophoblastique et entre par saccades dans la chambre intervillieuse à une pression comprise entre 70 et 80 mmHg. Cette pression permet au sang maternel d'atteindre la plaque chorale du placenta. Le sang de la chambre intervillieuse est renouvelé 3 à 4 fois par minute. Le sang maternel, en contact direct avec le ST des villosités chorales, assure les échanges entre la mère et le fœtus (Figure 8). Dans l'espèce humaine, les circulations sanguines fœtale et maternelle restent séparées. Les échanges fœto-maternels se font à travers les couches cellulaires trophoblastiques.

5) Placenta définitif

À terme, le placenta est un disque d'environ 20 cm de diamètre, de 3 cm d'épaisseur au centre du disque placentaire. Il pèse approximativement 500 g. Il est expulsé quelques minutes après l'accouchement au cours de **la délivrance**. Il présente une **face fœtale et une face maternelle** aisément distinguables. La **face fœtale**, d'aspect lisse tapissée par l'amnios et à laquelle s'insère le cordon ombilical, est appelée la **plaque chorale**. Le cordon ombilical définitif comprend 2 artères qui drainent le sang de l'embryon vers le placenta et une veine ombilicale qui ramène le sang, qui a circulé dans les villosités chorales, vers le cœur de

l'embryon. Ces vaisseaux, qui cheminent dans le cordon ombilical, se ramifient alors sur la face fœtale du placenta. La **face maternelle** reliée au myomètre, d'aspect rugueux, est appelée **plaque basale**. Cette face du placenta est creusée par des sillons qui délimitent des lobules appelés des **cotylédons**. Entre ces deux plaques, les villosités choriales flottent dans la chambre intervillieuse dans laquelle circule le sang maternel (environ 150 ml au 9^{ème} mois de grossesse). Au 3^{ème} trimestre de la grossesse, 20 à 25 % du débit cardiaque maternel sert à perfuser l'utérus ainsi que la chambre intervillieuse. La croissance fœtale est directement dépendante de cette perfusion placentaire. A terme, le rapport entre le volume placentaire et le volume fœtal est de 1/6 quand il était de 6/1 au début de la grossesse.

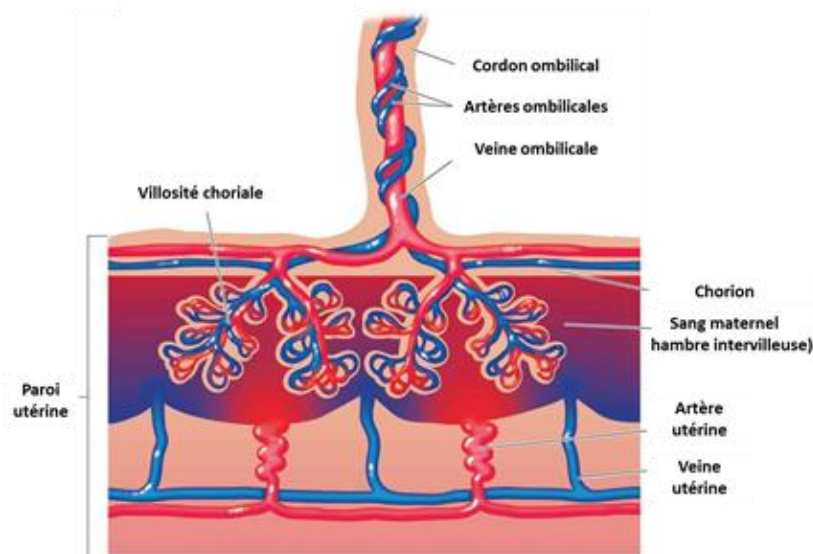


Figure 8: Circulation sanguine placentaire définitive.

D'après <http://schoolbag.info/biology/mcat/15.html>. Le remodelage des artères utérines permet d'adapter la perfusion placentaire aux besoins métaboliques du fœtus qui se développe. Le sang maternel atteint la chambre intervillieuse via les artères utérines spiralées. Le sang quitte la chambre intervillieuse par les veines utérines. Les circulations maternelle et fœtale ne sont jamais en contact direct au cours de la grossesse.

B- Fonctions du placenta humain

Les nombreux travaux réalisés ces dernières années ont permis de montrer que le placenta, qualifié à tort de barrière placentaire, est au contraire l'organe des échanges de la mère vers le fœtus mais aussi du fœtus vers la mère. Au cours de la grossesse, le placenta sert de poumons, d'intestin, de rein et de foie pour le fœtus. Il remplit ces diverses fonctions endocrines, d'échanges et de protection du fœtus à travers le syncytiotrophoblaste.

1) Fonction endocrine

L'une des fonctions majeures du placenta est sa capacité à produire des hormones et des facteurs multiples et variés indispensables au bon déroulement de la grossesse. Ces hormones placentaires sont nécessaires à l'établissement, au maintien de la gestation mais aussi au développement fœtal ainsi qu'à la mise en place du travail après neuf mois de grossesse. L'activité endocrine du placenta est majoritairement portée par le syncytiotrophoblaste qui possède la machinerie enzymatique et autres équipements nécessaires à la synthèse des hormones placentaires. On distingue deux types de productions hormonales par le placenta, des **hormones stéroïdes** et des **hormones polypeptidiques**.

a) Hormones stéroïdiennes

Les principales hormones stéroïdiennes synthétisées par le placenta sont la progestérone (Pg) et les œstrogènes.

Le mot **progestérone** vient du latin **pro-** signifiant qui favorise et de **gestare-** qui signifie porter un petit. Indispensable à la mise en place de la gestation, la Pg est produite par le corps jaune ovarien dans les premières semaines de la grossesse. Entre la 6^{ème} et la 8^{ème}

semaine de grossesse, le placenta prend le relais de la production de la Pg. Les taux de Pg circulants augmentent progressivement pour atteindre une concentration plasmatique maternelle de 130 ng/ml en fin de gestation. Une diminution de la concentration circulante de Pg semble être nécessaire à la mise en place de la parturition (Zakar and Hertelendy, 2007). La synthèse de Pg se réalise en deux temps. La première étape consiste en la **conversion de cholestérol en prégnénone**. Cette étape est dépendante du cytochrome P450sc mitochondrial (CYP11A1) et du transporteur de cholestérol appelé **metastatic lymph node 64 protein (MLN64)**. La production placentaire de cholestérol étant très faible, le cholestérol est essentiellement issu de lipoprotéines de basse densité (LDL) venant de la mère mais également du fœtus (Hill et al., 2014). La seconde étape consiste à **transformer la prégnénone en progestérone** grâce à la 3 β-hydroxystéroïde déhydrogénase 1 (HSD3B1).

La Pg participe au maintien de la grossesse en exerçant ses effets à divers niveaux. Elle agit principalement sur l'utérus en favorisant la décidualisation des cellules stromales. Plus précisément, la Pg i) bloque les effets pro-prolifératifs des œstrogènes et ii) contrôle l'expression de facteurs de transcription clés tels que C/EBPβ, FOXO1, HOXA 10 et Hand2 (Bhurke et al., 2016; Halasz and Szekeres-Bartho, 2013). La Pg est décrite comme un modulateur de l'immunotolérance notamment en augmentant la sécrétion de cytokines de type Th2 et en inhibant l'activité cytolytique des uNK. La Pg prépare les glandes mammaires à la lactation en favorisant la prolifération de l'épithélium mammaire. Enfin, la Pg est surtout décrite comme une hormone à action tocolytique tout au long de la grossesse. Cet effet, passe, en partie, par des mécanismes non génomiques *via* les récepteurs membranaires de la Pg (Ruddock et al., 2008). La Pg exerce son effet myorelaxant en inhibant i) la production en adénosine monophosphate cyclique (AMPC), ii) la mobilisation intracellulaire en Ca²⁺ et

iii) des gènes qui favorisent la contraction comme le récepteur à l'ocytocine ou le récepteur aux prostaglandines F2 α (Costa, 2016; Mesiano and Welsh, 2007; Eta et al., 1994). Cette propriété myorelaxante de la Pg en fait un bon candidat dans la prévention de la prématurité.

On distingue trois types d'oestrogènes placentaires : l'**oestrone** (E1), l'**oestradiol** (E2) et l'**oestriol** (E3). Comme la Pg, les œstrogènes passent, à partir de la 8^{ème} semaine de grossesse, d'une production ovarienne vers une production majoritairement placentaire. Les taux d'œstrogènes augmentent tout au long de la gestation mais à des quantités moindres (0,07 à 16 ng/ml à la fin de la gestation). La synthèse des œstrogènes reflète parfaitement l'interdépendance entre la mère, le fœtus et le placenta. En effet, le placenta est dépourvu de l'équipement enzymatique permettant la conversion de la prégnénolone et de la Pg en androgènes (précurseurs des œstrogènes). Le placenta utilise donc les androgènes de types dehydroepiandrosterone (DHEA) et DHEA sulfaté (DHEA-S) issus des surrénales fœtales. Dans le ST, le cytochrome P450 aromatase peut alors convertir la DHEA en E2 et E1. Les fonctions de l'E3 sont peu connues. Néanmoins, certaines études suggèrent que l'E3 est impliqué dans l'initiation de la parturition (Di et al., 2001; Goodwin, 1999). L'E2, qui est l'œstrogène la plus active au cours de la grossesse, favorise l'implantation embryonnaire en régulant i) la différenciation endométriale et ii) la perfusion utéroplacentaire. A terme, les œstrogènes favorisent les contractions myométriales et par conséquent l'initiation du travail. Le rôle de l'E2 dans les trophoblastes n'est pas clairement déterminé néanmoins des études ont montré que l'E2 favorise la syncytialisation des CTV *via* le récepteur aux œstrogènes RE α . Cet effet pro-différenciant semble être lié à l'augmentation de l'expression de la leptine (voir plus loin) (Bukovsky et al., 2003; Gambino et al., 2010).

b) Hormones polypeptidiques

L'**hormone chorionique gonadotrope** (hCG), aussi appelée hormone de la grossesse, est le **1^{er} messenger d'origine trophoblastique détectable dans la circulation maternelle**. L'hCG est une glycoprotéine d'environ 37 kDa composée d'une sous-unité α et d'une sous-unité β . La sous-unité α présente de grandes similitudes avec la sous-unité α des hormones gonadotropes hypophysaires telles que la **LH** (hormone lutéinisante), la **FSH** (hormone folliculo-stimulante) ou la **TSH** (hormone thyroïdienne). Cette sous-unité α , glycosylée sur deux sites de N-glycosylation, est codée par le gène CGA (Glycoprotein Hormones Alpha Polypeptide) qui est situé sur le chromosome 6. La spécificité d'action de l'hCG provient de sa sous-unité β . Cette sous-unité β , composée de 145 acides aminés, présente deux sites de N-glycosylations, quatre sites d'O-glycosylations et est codée par six gènes (CGB1, CGB2, CGB3, CGB5, CGB7, et CGB8) regroupés dans un cluster situé sur le chromosome 19. Soixante à 80 % de l'hCG- β placentaire humaine est codée par les gènes CGB5 et CGB8. La sécrétion, l'activité biologique et la demi-vie de l'hCG sont dépendantes de son état de glycosylation. L'hCG partage les mêmes récepteurs que la LH (**R-LH/hCG**), un récepteur couplé aux protéines G et dont la liaison induit une activation de la voie de l'AMPc et de la protéine kinase A (PKA). Les récepteurs à l'hCG sont exprimés à la surface des CTV, des CTEV et du ST. L'hCG est mesurable dans la circulation sanguine et dans l'urine maternelle sept jours après la conception, c'est-à-dire avant l'implantation embryonnaire. Le taux d'hCG plasmatique maternelle augmente progressivement jusqu'à atteindre un pic à la 10^{ème} semaine de grossesse à partir duquel il décline tout au long de la grossesse. Il est bien établi que le ST est la source principale d'hCG circulante. Cependant, il a été montré que les CTEV invasifs sécrètent également des quantités non négligeables d'hCG. L'hCG produite par les

CTEV invasifs présente une **forme hyper-glycosylée**, par comparaison avec l'hCG produite par les CTV, que l'on appelle **hCG-H**. L'hCG-H représente 90 % de l'hCG totale présente dans la circulation maternelle à la 3^{ème} semaine de grossesse. Très présente au début de la grossesse, elle diminue tout au long du 1^{er} trimestre de la grossesse à la faveur de l'hCG sécrétée par le ST (Cole, 2010). L'hCG et l'hCG-H semblent réguler des processus indépendants au cours de l'implantation embryonnaire.

L'hCG synthétisée par le ST est une hormone aux fonctions pléiotropes qui agit de manière autocrine et paracrine. Elle participe au **maintien de la grossesse** notamment en prenant le relais de la LH hypophysaire maternelle et en permettant la transformation du corps jaune ovarien cyclique en corps jaune gravidique. L'hCG assure ainsi la production de la progestérone pendant les 6 premières semaines de la grossesse. L'hCG exerce des fonctions paracrines notamment sur la **différenciation des vaisseaux sanguins endométriaux**. Elle favorise la vasodilatation, l'angiogenèse et l'expression de facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF. L'hCG semble participer à la **quiescence du myomètre** au cours de la gestation. Comme la progestérone elle favorise la mise en place d'un phénomène de **tolérance à l'interface fœto-maternelle**. En effet, l'hCG i) attire les lymphocytes T régulateurs (Treg) dans l'endomètre en stimulant l'expression des R-LH/hCG des Treg et ii) favorise la sécrétion des IL-8 et IL-10 qui sont des cytokines anti-inflammatoires (Schumacher et al., 2009).

L'hCG exerce également des fonctions autocrines sur la **différenciation trophoblastique** du CTV en ST. Plus précisément, elle stimule la syncytialisation en augmentant l'expression de deux facteurs clés de la différenciation : la **leptine** et le facteur de transcription **glial cell missing factor 1 (GCM1)**. GCM1 stimule l'expression de la syncytine 2 et de son récepteur spécifique MFSDA2 en se liant aux promoteurs de ces deux gènes (Liang et al., 2010). L'hCG-

H favorise l'invasion trophoblastique des CTEV de manière autocrine en stimulant la sécrétion de protéases (Evans, 2016).

L'expression de l'hCG par le ST est régulée entre autres par le récepteur nucléaire **peroxysome proliferator-activated receptor gamma** (PPAR- γ). De manière surprenante, dans le ST, ce facteur de transcription contrôle positivement l'expression d'hCG et négativement l'expression d'hCG-H (Hands Schuh et al., 2009). De plus, il a été montré que la GnRh, la leptine (Islami et al., 2003), l'activine (Petraglia et al., 1989), le cortisol (Wang et al., 2014) et l'EGF (Morrish et al., 1987) stimulent l'expression de l'hCG. Le dosage de l'hCG est utilisé pour le diagnostic de la grossesse. Il est également utilisé comme un marqueur d'anomalies placentaires. Des taux anormaux d'hCG associés à des images échographiques peuvent être utilisés afin de dépister des pathologies de la grossesse telles que la trisomie 21, des tumeurs placentaires, des grossesses ectopiques ou des fausses couches à répétition.

L'**hormone lactogène placentaire** (hPL), aussi appelée hormone chorionique somatotrope, est une hormone placentaire non glycosylée composée de 191 acides aminés. Elle présente de fortes similitudes de structure et de fonction avec l'hormone de croissance (GH) et la PRL (Niall, 1971). L'hPL est l'hormone placentaire la plus abondamment produite par le placenta humain. Les gènes codants pour l'hPL (HPL-A, HPL-B et HPL-L) sont situés dans un cluster de gènes situé sur le chromosome 17. L'hPL est sécrétée principalement par le ST et, de manière moindre, par les CTEV (Tarrade et al., 2001a). Elle est détectée dès la 3^{ème} semaine de gestation dans la circulation maternelle et, de manière moindre, dans la circulation foetale à partir de la 6^{ème} semaine de la grossesse. Les taux circulants d'hPL augmentent tout au long de la gestation et semblent être associés à l'augmentation de la masse placentaire et plus spécifiquement de la masse du ST (Sciarra et al., 1968). L'hPL agit en se fixant aux

récepteurs de la PRL et de la GH . Le rôle physiologique de l'hPL reste mal élucidé. Cette hormone semble réguler le métabolisme énergétique de la mère mais également celui du fœtus comme le suggère la présence de récepteurs de l'hPL dans le foie fœtal (Handwerger and Freemark, 2000). L'hPL joue un rôle d'antagoniste de l'insuline et participe ainsi à l'insulino-résistance caractéristique de la grossesse. Par cette voie, l'hPL favorise l'apport des nutriments au fœtus. De plus, les travaux réalisés *in vitro* sur des cellules hépatiques, myoblastiques et pancréatiques fœtales, ont montré une augmentation de l'expression et de la sécrétion d'IGF-1 en réponse à l'hPL. Ces travaux suggèrent que l'hPL pourrait avoir une action somatotrope sur les tissus fœtaux. Enfin, cette hormone participe à la lactogénèse en favorisant la prolifération puis la différenciation des cellules mammaires. L'hPL n'est pas indispensable à la gestation comme le montre l'évolution normale de la grossesse chez des patientes présentant des délétions géniques pour l'hPL (Nielsen et al., 1979).

L'hormone de croissance placentaire (hPGH) est le produit du gène GH-V exprimé spécifiquement dans le placenta. L'hPGH et l'hPL présentent de nombreux points communs dont le cluster de gènes qu'ils partagent. D'origine trophoblastique, l'hPGH diffère de la GH hypophysaire par 13 acides aminés seulement. L'hPGH remplace progressivement la GH hypophysaire maternelle qui devient indétectable au 2nd trimestre de la grossesse. Elle est essentiellement produite par le ST de manière continue à partir du 2^{ème} trimestre. Les CTEV invasifs sont également capables de produire l'hPGH au cours du 1^{er} trimestre de la grossesse (Lacroix et al., 2005; Alsat et al., 1998). L'hPGH active les récepteurs à la GH et à la PRL. Comme l'hPL, l'hPGH agit sur le métabolisme maternel en augmentant la synthèse d'IGF-1 maternelle et en induisant une insulino-résistance au cours de la grossesse. Ainsi, l'hPGH semble favoriser l'apport nutritionnel au fœtus (Alsat et al., 1998).

Leptine et resistine

Le tissu adipeux communique avec de nombreux organes périphériques par le biais de molécules qu'il produit et que l'on qualifie d'adipokines. Les adipokines sont surtout décrites pour leur implication dans des pathologies métaboliques liées à l'obésité ou à l'inflammation. Néanmoins certaines de ces adipokines jouent un rôle dans la fonction de reproduction.

La **leptine** est l'une des adipokines les plus étudiées. La leptine est la 1^{ère} adipokine identifiée dans les années 1990. C'est un peptide de 16 kD codé par le **gène Ob**. Décrite comme une **hormone de la satiété**, elle régule la prise alimentaire et l'homéostasie énergétique. En dehors de la grossesse, la leptine est principalement sécrétée par les adipocytes et son taux circulant est proportionnel à la masse adipeuse. L'importance de la leptine dans la fonction de reproduction a été démontrée à l'aide de souris invalidées pour le gène Ob. En effet, ces souris sont stériles et l'apport exogène de leptine parvient à restaurer leur fertilité (Chehab et al., 1996). Au cours de la grossesse, le placenta humain et plus particulièrement le ST produit de grandes quantités de leptine. Cette adipokine est sécrétée dans les circulations maternelle, fœtale et également dans le liquide amniotique (Henson et al., 1998; Schubring et al., 1999). La leptine agit *via* son **récepteur spécifique Rob**. Ce récepteur est exprimé à la surface des ST, ce qui suggère que la leptine exerce des effets autocrines. En effet, la leptine **favorise la sécrétion d'hCG** et inhibe la production d'E2, de Pg et d'hPGH par le ST (Cameo et al., 2003; Coya et al., 2006; Zeck et al., 2008). Elle favorise la prolifération, *in vitro*, des cytotrophoblastes humains (Magariños et al., 2007). Une étude a montré qu'elle exerce un effet anti-apoptotique sur les cellules humaines de la lignée trophoblastique Swan-71. Cette lignée dérive de trophoblastes issus de placentas de 7 SA, immortalisés par la télomérase

reverse transcriptase humaine (hTERT) (Toro et al., 2014). La leptine exerce également des **effets sur l'utérus**. En effet, une étude réalisée *in vitro* sur des cellules HUVEC (dérivées d'endothélium veineux), a montré que la leptine favorise l'angiogenèse (Bouloumié et al., 1998). De plus, une diminution de l'expression de la leptine a été observée dans des biopsies d'endomètre provenant de femmes présentant des échecs répétés d'implantation (Dos Santos et al., 2012).

La fin du 2nd trimestre de grossesse est associée à une leptino-résistance chez la mère, qui induit une perte de la satiété et par conséquent une hyper-insulinémie qui semble nécessaire à un apport nutritionnel adéquat du bébé. En conclusion, la leptine est aujourd'hui considérée comme une véritable hormone placentaire.

Moins connue que la leptine, la **résistine** est un polypeptide riche en cystéine de 12,5 kDa, découvert en 2001 dans le tissu adipeux blanc murin. Chez l'Homme, la résistine est surtout sécrétée par les macrophages. Les fonctions de cette adipokine n'ont pas été clairement élucidées. Néanmoins, elle semble induire une insulino-résistance ainsi que la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires chez l'Homme (Park and Ahima, 2013). Les cibles moléculaires de la résistine dans le placenta sont inconnues. Cependant, il semblerait qu'elle soit produite par le placenta, plus particulièrement par le ST et les CTEV. Les données sur les taux maternels de résistine divergent en fonction des études. Certaines équipes décrivent une augmentation de la sécrétion de cette hormone tout au long de la grossesse (Nien et al., 2007). D'autres équipes affirment, au contraire, que les taux maternels de résistine diminuent au cours de la gestation (Cortelazzi et al., 2007). Des études, *in vitro*, ont montré que la résistine dans les trophoblastes stimule i) la consommation de glucose *via* l'augmentation du transporteur de glucose GLUT-1 et ii) l'invasion des cellules humaines de

la lignée Bewo issues de choriocarcinomes (Di Simone et al., 2006, 2009). Enfin, la résistine semble réguler l'angiogenèse endométriale notamment en favorisant l'expression de facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF.

Les **kisspeptines** (Kp) sont des neuropeptides hypothalamiques découverts au début des années 2000. Ces Kp dérivent d'un même précurseur de 145 acides aminés codé par le gène Kiss 1. Le clivage du précurseur conduit à une forme active longue de 54 acides aminés, appelée Kp54. Par clivages successifs, la Kp54 donne naissance à des formes plus courtes contenant 14, 13 ou 10 acides aminés (Kp14, Kp13 et Kp10). Les kisspeptines et leurs récepteurs spécifiques Kiss1R, sont exprimés dans le placenta humain. Plus précisément, les Kiss1R sont exprimés majoritairement dans le ST mais également de manière moindre dans les CT et les CTEV. La sécrétion maternelle de la kisspeptine Kp54 augmente tout au long de la grossesse. Les kisspeptines participent au développement placentaire notamment en bloquant l'angiogenèse endométriale *via* l'inhibition de l'expression du transcrit VEGF-A. De plus, il a été décrit que Kp10 agit comme une molécule inhibant l'invasion trophoblastique des CTEV. Nous reviendrons plus en détail sur les kisspeptines dans la chapitre II-A.

Concentrations sériques

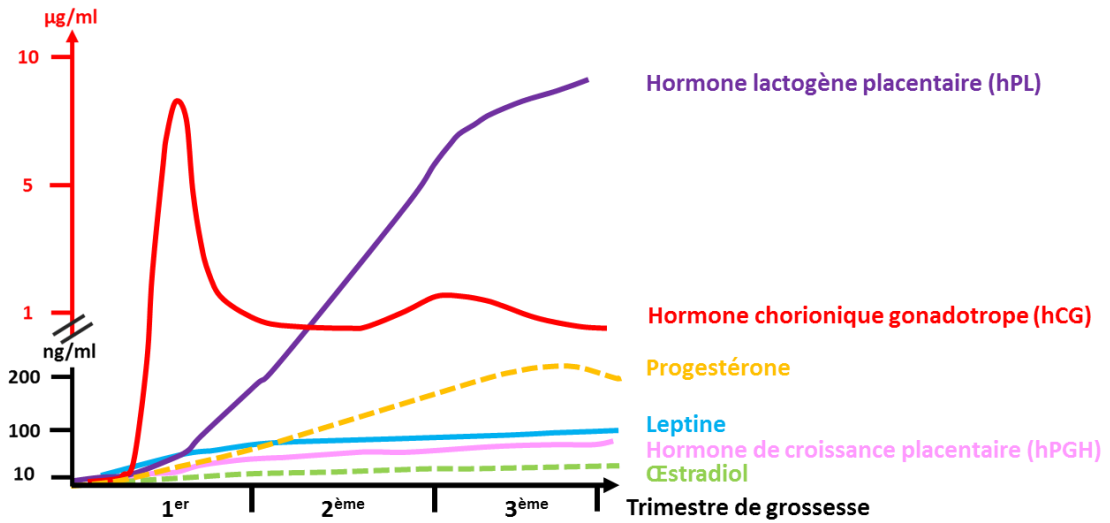


Figure 9: Profil sérique maternel.

Les hormones lactogène placentaire et chorionique gonadotrope sont les hormones les plus abondamment produites au cours de la grossesse (µg/ml).

Tableau 1: Récapitulatif de la production hormonale placentaire humaine.

Type	Hormone	Fonctions principales
Hormones stéroïdes	Progestérone	<ul style="list-style-type: none"> ↗ la décidualisation de l'endomètre ↗ l'implantation embryonnaire ↗ la quiescence du myomètre
	Œstrogènes	<ul style="list-style-type: none"> ↗ la prolifération de cellules endométriales ↗ l'implantation embryonnaire ↗ les contractions du myomètre et l'initiation du travail ↗ le développement des glandes mammaires
Hormones polypeptidiques	hCG	<ul style="list-style-type: none"> ↗ le maintien de la grossesse ↗ le maintien du corps jaune et la sécrétion de la Pg ↗ la quiescence du myomètre ↗ la tolérance immunitaire
	hCG-H	<ul style="list-style-type: none"> ↗ l'invasion trophoblastique
	hPL	<ul style="list-style-type: none"> ↗ le métabolisme glucidique fœto-maternel ↗ l'insulino-résistance ↗ le développement des glandes mammaires, lactation
	hPGH	<ul style="list-style-type: none"> ↗ le métabolisme glucidique fœto-maternel ↗ l'insulino-résistance ↗ l'apport nutritionnel au fœtus
	Leptine	<ul style="list-style-type: none"> ↗ la sécrétion d'hCG ↗ la prolifération, la différenciation et l'invasion trophoblastique ↗ l'angiogenèse ↗ le métabolisme énergétique maternel ↗ l'apport nutritionnel au fœtus
	Résistine	<ul style="list-style-type: none"> ↗ consommation de glucose ↗ invasion trophoblastique
	Kisspeptine	<ul style="list-style-type: none"> ↘ l'invasion trophoblastique ↘ l'angiogenèse

2) Fonction d'échanges

Le placenta évolue au cours de la gestation et s'adapte aux besoins du fœtus. Cette fonction d'échanges a des impacts directs sur la croissance fœtale qui est dépendante des apports en nutriments. Jusqu'au 2^{ème} trimestre de la grossesse, l'embryon se développe grâce à une nutrition histotrophe issue des sécrétions des glandes utérines qui sont déversées dans la chambre intervillieuse. Les fonctions d'échanges du placenta acquièrent leur importance avec l'entrée du sang maternel dans la chambre intervillieuse. Les échanges entre la mère et le fœtus mais aussi du fœtus vers la mère font intervenir différents mécanismes. Certains composés tels que **l'eau**, **l'urée** et les **gaz respiratoires** diffusent librement entre la mère et le fœtus, on parle de **diffusion passive**. La diffusion passive concerne des molécules de faible poids moléculaire, lipophiles ou hydrophiles et elle est dépendante des gradients de concentration entre la circulation maternelle et la circulation fœtale. D'autres échanges plus complexes font intervenir des transporteurs membranaires c'est le cas des échanges en hydrates de carbonés, en acides aminés, en lipides ou en immunoglobulines

a) Transport de glucose

Le fœtus n'est pas capable d'assurer la voie de la néoglucogenèse. La croissance fœtale est donc totalement dépendante des apports maternels en glucose. Les apports en glucose maternel se font grâce à un **transport facilité** faisant intervenir des transporteurs de glucose appelés **GLUT**. Les GLUT 1, 3, 4 et 12 sont exprimés à la surface des trophoblastes et de l'endothélium fœtal. GLUT1, très exprimé dans le ST, est considéré comme le transporteur principal du glucose vers le fœtus. GLUT1 capte le glucose dans la circulation maternelle. Une fois dans la villosité, le glucose traverse l'endothélium des capillaires fœtaux *via* GLUT3. On estime que 60 % du glucose maternel est métabolisé par le placenta pour son propre

fonctionnement et que 40 % du glucose maternel est transporté au fœtus. On observe une évolution du profil d'expression des GLUT en fonction de l'âge gestationnel. En effet, GLUT4 et GLUT12 sont exprimés dans le ST uniquement au début de la grossesse. De plus, au 1^{er} trimestre de la grossesse, GLUT3 est exprimé essentiellement dans le CT. En revanche au 3^{ème} trimestre de la grossesse, GLUT3 est exprimé dans les cellules endothéliales vasculaires, dans les vaisseaux sanguins fœtaux et dans les cellules stromales. Toute hyperglycémie maternelle entraîne inévitablement une élévation de la glycémie chez le fœtus. Les variations glycémiques maternelles ont des retentissements catastrophiques sur le fœtus, notamment dans le cas du diabète gestationnel (Lager and Powell, 2012).

b) Transport d'acides aminés

Contrairement au glucose, les acides aminés sont transportés au fœtus contre leur gradient de concentration. L'apport d'acides aminés au fœtus fait donc intervenir un **transport actif**. On dénombre plus de 15 transporteurs d'acides aminés dans le placenta humain. Le transport d'acides aminés au fœtus permet la synthèse de protéines fœtales. Le fœtus n'est pas apte à synthétiser les acides aminés non essentiels. Le transport des acides aminés maternels est donc essentiel pour le fœtus. Le transport de certains acides aminés fait intervenir des **transporteurs Na⁺ dépendants**. C'est le cas des acides aminés faisant intervenir des transporteurs du système A (Ala, Ser, Pro, Gln), du système ASC (Ala, Ser, Cys), du système B^o (acides aminés neutres, Val, Leu, Ile), du système N (Gln, Asn, His) et du système GLY (gly). La majorité des acides aminés cationiques et aromatiques font intervenir des **transporteurs Na⁺ indépendants**. Parmi eux, se trouvent les transporteurs du système γ^+ (acides aminés cationiques), les transporteurs associés à une glycoprotéine b^{o+} (acides aminés cationiques et neutres), les transporteurs du système L (acides aminés neutres et

aromatiques) et l'échangeur glutamate/cystéine (Xc⁻). On estime que 99 % des acides aminés maternels traversant le placenta sont transportés au fœtus. Un dérèglement du transfert placentaire des acides aminés a souvent été associé à des retards de croissance intra-utérins (Brett et al., 2014).

c) Transport d'acides gras

Les acides gras et différents lipides incorporés par le placenta sont liés à des protéines de transport. Les acides gras libres sont transportés grâce à l'albumine sérique. Les phospholipides, le triacylglycérol et le cholestérol sont transportés dans des lipoprotéines. Les acides gras et leurs dérivés sont particulièrement nécessaires à la croissance et au développement fœtal. Les acides gras et le glycérol peuvent traverser le ST par simple diffusion mais également à l'aide de différents transporteurs tels que les « fatty acids binding protein » (FABP), les « fatty acid translocase » (FAT) ou les « fatty acid transporter protein » (FATP). Après internalisation des lipoprotéines maternelles dans la villosité, par endocytose sélective, celles-ci sont hydrolysées par des lipases placentaires. Les acides gras sont alors susceptibles d'être transportés au fœtus (Brett et al., 2014). On estime que 80 % des lipides maternels captés par le placenta sont transporté vers le fœtus.

d) Transport des immunoglobulines G

Le système immunitaire fœtal et néonatal est immature. L'acquisition **d'immunoglobulines G** (IgG) maternelles se fait donc exclusivement en période prénatale *via* le placenta. Les IgG étant de haut poids moléculaire (environ 150 kDa), le passage placentaire s'effectue par **trans-endocytose**. Dans un premier temps, les IgG pénètrent dans le ST par micro-endocytose. Dans un second temps, ils sont assemblés aux récepteurs Fc-γ dans des

endosomes où le pH est acide (pH 6). Ce transfert d'IgG est nécessaire à la protection du fœtus jusqu'à ce que son système immunitaire se mette en place après sa naissance (Palmeira et al., 2012).

Le ST est capable de transporter beaucoup d'autres molécules sur lesquelles nous ne nous sommes pas focalisés dans cette présentation non-exhaustive des fonctions d'échanges du placenta. Comme nous l'avons dit dans l'introduction, le placenta permet le transport d'eau entre la mère et le fœtus par diffusion facilitée mais également à l'aide de canaux protéiques membranaires appelés aquaporines. Le placenta permet le transfert d'anions et de cations au fœtus à l'aide de canaux spécifiques. Le fœtus est totalement dépendant du fer maternel et cet apport en fer s'effectue grâce à la liaison de la transferrine à ses récepteurs situés sur la membrane des villosités.

3) Fonction de respiration

Le placenta est responsable des échanges de gaz respiratoires entre la mère et le fœtus. Il sert de poumons du fœtus au cours de la gestation en régulant les apports en O₂ et l'élimination du CO₂ fœtal. Le placenta étant très perméable aux gaz respiratoires, le transport se fait de manière passive à travers le ST. On distingue deux périodes distinctes dans les échanges de gaz au cours de la grossesse. Au cours du premier trimestre, les apports en O₂ au fœtus se limitent au strict minimum. En revanche, au cours du 2^{ème} et du 3^{ème} trimestre, les pressions fœtales en oxygène augmentent progressivement. L'oxygénation du sang fœtal est favorisée par la grande affinité de l'hémoglobine fœtale pour l'O₂. De plus, la pression partielle en O₂ fœtal est inférieure à la pression en O₂ dans la circulation maternelle.

L'ensemble des fonctions d'échanges entre la mère et le fœtus est résumé dans la figure 10.

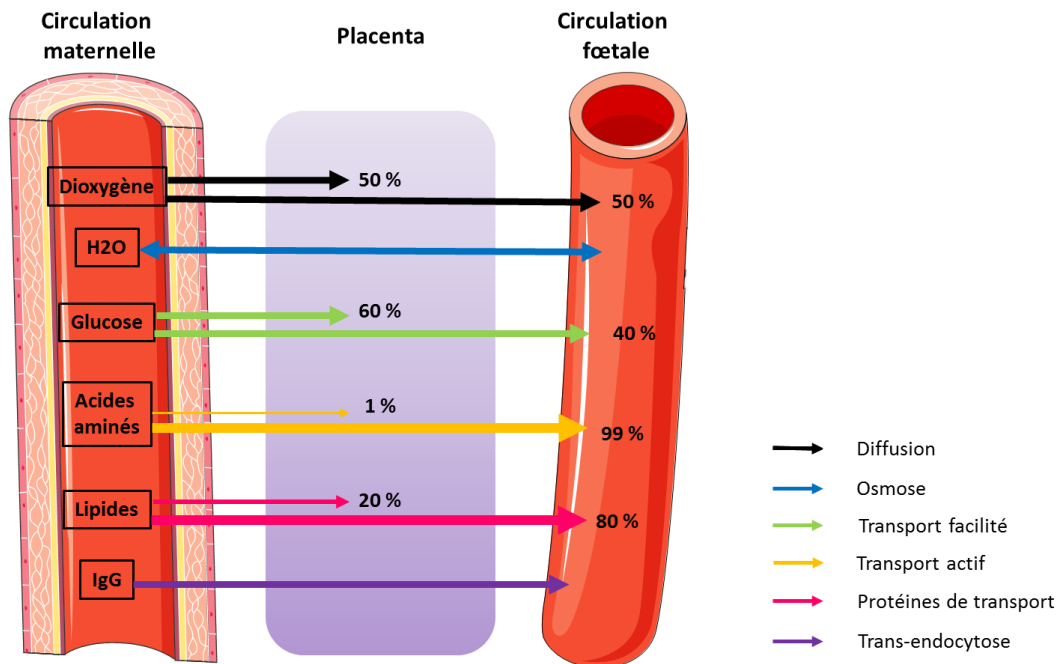


Figure 10: Les échanges fœto-maternels.

Le placenta régule les échanges de nutriments et de gaz entre la mère et le fœtus, ainsi que l'évacuation des déchets fœtaux vers la mère. Le syncytiotrophoblaste est l'acteur majeur de ces échanges materno-fœtaux et fœto-maternels. Le placenta présente une perméabilité différentielle en fonction du type d'échange.

4) Fonction immunitaire

En 1953, Sir Peter Medawar, prix Nobel en 1960 pour ses travaux en immunologie, émettait l'hypothèse que l'initiation et le maintien de la grossesse humaine dépendait de la mise en place d'une tolérance à l'interface fœto-maternelle. Depuis, les concepts et les connaissances en immunologie de la reproduction ont évolué et différents mécanismes favorisant cette immunotolérance ont été décrits.

L'embryon qui est souvent assimilé à un greffon semi-allogénique, présente le risque que les antigènes paternels qu'il exprime soient reconnus comme du « non-soi » par l'organisme

maternel. Afin d'échapper aux menaces du système immunitaire maternel, le trophoblaste adopte plusieurs stratégies.

Dans un premier temps, l'embryon **limite son antigénicité** *via* la régulation des **molécules d'histocompatibilité** exprimées à sa surface. Afin de prévenir les attaques cytotoxiques, médiées par les lymphocytes T maternels CD8⁺, les cellules trophoblastiques n'expriment pas à leur surface des molécules HLA (human leukocyte antigen) de classe I « classiques » (HLA-A et B) connus pour être polymorphes et pour leur implication dans les phénomènes de rejets lors de greffe. De plus, les trophoblastes n'expriment pas de molécules HLA de classe II afin d'éviter une réaction allo-antigénique et l'activation des lymphocytes T maternels. En revanche, le trophoblaste exprime des **molécules HLA de classe I « non classiques » (HLA-C, E et G), monomorphe et mauvais présentateur d'antigènes.** L'expression de HLA-C, E et G permet au trophoblaste d'être reconnu comme du « soi » et donc de ne pas être détruit par le système immunitaire maternel. La molécule HLA-G est exprimée à la surface des CTV, du ST et plus particulièrement à la surface des CTEV. Dans les CTEV, la présence des molécules d'HLA-G permet également d'**inhiber la prolifération et l'activation des lymphocytes T CD4⁺.** Les CTEV sécrètent **l'indolamine 2,3-dioxygénase (IDO).** Cette enzyme est responsable de la dégradation du tryptophane. La privation locale de tryptophane à l'interface fœto-maternelle participe également à l'inhibition de la prolifération et de l'activation des lymphocytes. De plus, les CTEV sont capables d'induire **l'apoptose des lymphocytes B et T activés et spécifiques des antigènes fœto-placentaires.** Pour cela, les CTEV, qui expriment le **ligand Fas**, se lient aux récepteurs FasR exprimés par les lymphocytes activés. Il a été montré que l'hCG favorise l'expression trophoblastique du ligand Fas et que **l'HLA-G soluble, *in vitro*,** favorise la surexpression du FasR par les

lymphocytes T CD8⁺ (Perrier D’hauterive et al., 2002). Le trophoblaste peut également **inhiber la cytotoxicité des cellules immunitaires maternelle** *via* la sécrétion locale de molécules immunosuppressives telles que la Pg, l’hCG, l’HLA-G soluble, l’IDO, le transforming growth factor beta (TGF- β) et le progesterone induced blocking factor (PIBF). Afin de résister aux anticorps cytotoxiques produits par les lymphocytes B maternels, les cellules trophoblastiques produisent des protéines **neutralisant les molécules du complément**. Parmi ces molécules se trouvent le **decay accelerating factor (DAF)** et le **monocyte chemotactic protein (MCP)** (Holmes et al., 1992).

Enfin, le trophoblaste favorise la tolérance maternelle en **stimulant le recrutement et la différenciation des Treg, des macrophages et des uNK à l’interface foeto-maternelle**.

Les **lymphocytes T régulateurs (Treg)** sont une sous-population de lymphocytes T CD4⁺, CD25⁺. Au cours de la grossesse, les Treg s’accumulent dans la décidue où ils représentent 20 % des cellules T CD4⁺. Le trophoblaste participe au recrutement des Treg au site d’implantation. Pour cela, le trophoblaste produit des chimiokines (CCL4, CCL5, CXCL1 et CXCL8) qui se lient à leurs récepteurs spécifiques présents à la surface des Treg. D’autre part, plusieurs travaux ont montré que le trophoblaste induit la différenciation de cellules T CD4⁺ naïves (Th0) déciduales en Treg. Pour cela, les cellules trophoblastiques sécrètent du TGF- β 1 et de la prostaglandine E2 (PGE2) qui stimulent l’expression du marqueur de surface spécifique des Treg, Forkhead box P3 (Foxp3), (Du et al., 2014; Ramhorst et al., 2012). Dans l’utérus gravide, les Treg exercent leur fonction de **gardien de l’homéostasie immunitaire** en i) induisant l’apoptose des lymphocytes activés *via* la sécrétion de protéines cytolytiques telles que la perforine ou la granzyme, ii) en déprivant les lymphocytes activés de cytokines

de survie telle que l'IL2 et iii) en sécrétant des cytokines inhibitrices de l'activation des lymphocytes T telles que le TGF- β et l'IL10.

De même, les **macrophages** sont attirés à l'interface fœto-maternelle par les sécrétions chimiotaxiques d'origine trophoblastique telles que les CCL2, CCL3 et CCL5. Les macrophages M1 sont impliqués dans la réponse pro-inflammatoire et les macrophages M2 sont impliqués dans la réponse anti-inflammatoire. Le trophoblaste favorise la différenciation des macrophages vers la voie M2 et par conséquent la production d'IL1 et de PGE2, aux propriétés immunosuppressives (Svensson-Arvelund et al., 2015), Figure 11.

Les **uNK** jouent un rôle primordial dans le contrôle de l'immunité à l'interface fœto-maternelle. Ils représentent 70 % des cellules leucocytaires dans le site d'implantation de l'embryon et assurent la première ligne de défense contre les pathogènes dans le placenta. Ils sont présents dans l'endomètre sécrétoire à chaque cycle. Les trophoblastes favorisent l'arrivée massive d'uNK dans l'endomètre au cours des deux premiers trimestres de la grossesse *via* la sécrétion de cytokines et chimiokines telle que CXCL12 (Wu et al., 2005). Les uNK diffèrent des NK circulants par l'expression de marqueurs membranaires spécifiques qui leur confèrent un faible pouvoir cytotoxique et qui augmentent leurs propriétés immuno-modulatrices. Les uNK participent également au bon déroulement de la grossesse en protégeant le trophoblaste vis-à-vis des agents infectieux. Il a été observé dans des cas d'infection au cytomégalovirus humain (hCMV) que les uNK acquièrent leur phénotype cytotoxique d'origine et secrètent des cytokines et chimiokines anti-virales afin de limiter la propagation du virus au fœtus. L'adaptation des uNK dans le cadre de la grossesse est un exemple parfait du dialogue immunitaire établi à l'interface fœto-maternelle et où « **Killers become builders during pregnancy** » selon Le Bouteiller (Le Bouteiller and Tabiasco, 2006).

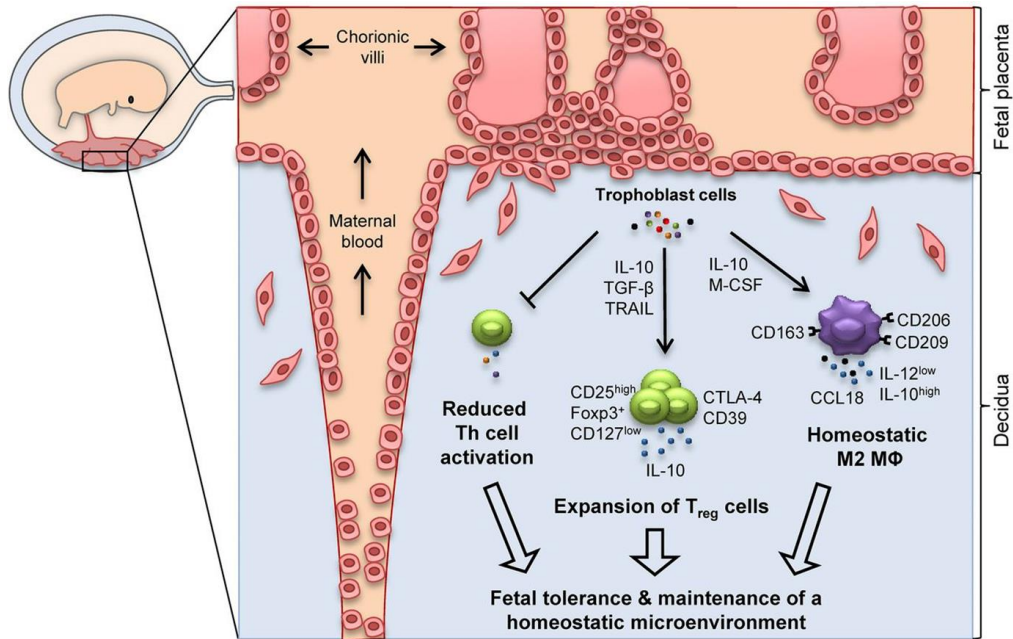


Figure 11: Mise en place de la tolérance maternelle par le trophoblaste.

D'après Svenson-Arvelund et al, 2015. Les trophoblastes sécrètent des cytokines, des chimiokines et des microparticules qui régulent le comportement des cellules immunitaires maternelles. Les cytotrophoblastes favorisent la voie M2, le recrutement de lymphocytes Treg et inhibe l'activation des lymphocytes T. Ainsi, les cytotrophoblastes participent à la mise en place d'un climat immunologique favorable à l'implantation embryonnaire. Th: lymphocyte T helper; TRAIL: Tumor necrosis factor (TNF) related apoptosis-inducing ligand; Foxp3⁺: Forkhead box P3; Treg: lymphocyte T régulateurs; M2 Mφ: macrophage de type 2.

Par ailleurs, le maintien de la grossesse implique une adaptation de l'environnement inflammatoire endométrial tout au long de la grossesse. Les lymphocytes T CD4⁺ participent plus particulièrement à la régulation de cet environnement inflammatoire. Les lymphocytes T CD4⁺ helper (Th) sont classés selon les cytokines qu'elles produisent, Figure 12.

Les **cellules Th1** sécrètent des cytokines pro-inflammatoires (IL2, interféron γ (INF γ), TNF β).

Ces cytokines activent l'immunité cellulaire et sont impliquées dans le rejet aigu de la greffe

allogénique. Les **cellules Th2** sécrètent des cytokines anti-inflammatoires (IL4, IL5, IL10). Ces cytokines activent l'immunité humorale et induisent la tolérance à la greffe allogénique. Jusque tout récemment, le climat immunologique à l'interface fœto-maternelle était réduit à la **balance Th1/Th2**. De manière simpliste, on qualifie la réponse Th1 de délétère et la réponse Th2 de favorable à la grossesse. Des travaux récents ont mis en évidence une évolution de la balance Th1/Th2 au cours de la grossesse. L'implantation embryonnaire qui fait intervenir une phase d'invasion profonde et un remodelage drastique de l'endomètre impose une réponse inflammatoire (type Th1). Cette réponse inflammatoire intense pourrait être la source des nausées et vomissements observés au 1^{er} trimestre de la grossesse. Au cours du 2nd trimestre de la grossesse, les cytokines de type Th2 sont majoritaires et induisent un environnement anti-inflammatoire propice au développement fœtal. Enfin, la mise en place du travail est induite par le retour d'un environnement pro-inflammatoire. Cette inflammation déclenche les contractions et l'expulsion du placenta (Mesdag et al., 2014; Sykes et al., 2012). Les cellules **Th17** qui sécrètent des cytokines pro-inflammatoires (IL17, GM-CSF, IL21, IL22, IL26) participent également au climat immunologique de la grossesse. Il est aujourd'hui admis que l'environnement pro-/anti-inflammatoire à l'interface fœto-maternel est régulé par la balance Th1-Th17/Th2-Treg (Piccinni et al., 2015; Saito et al., 2010). La grossesse humaine représente un modèle parfait d'adaptation du système immunitaire et de coopération entre des cellules d'origines différentes (maternelles et fœtales).

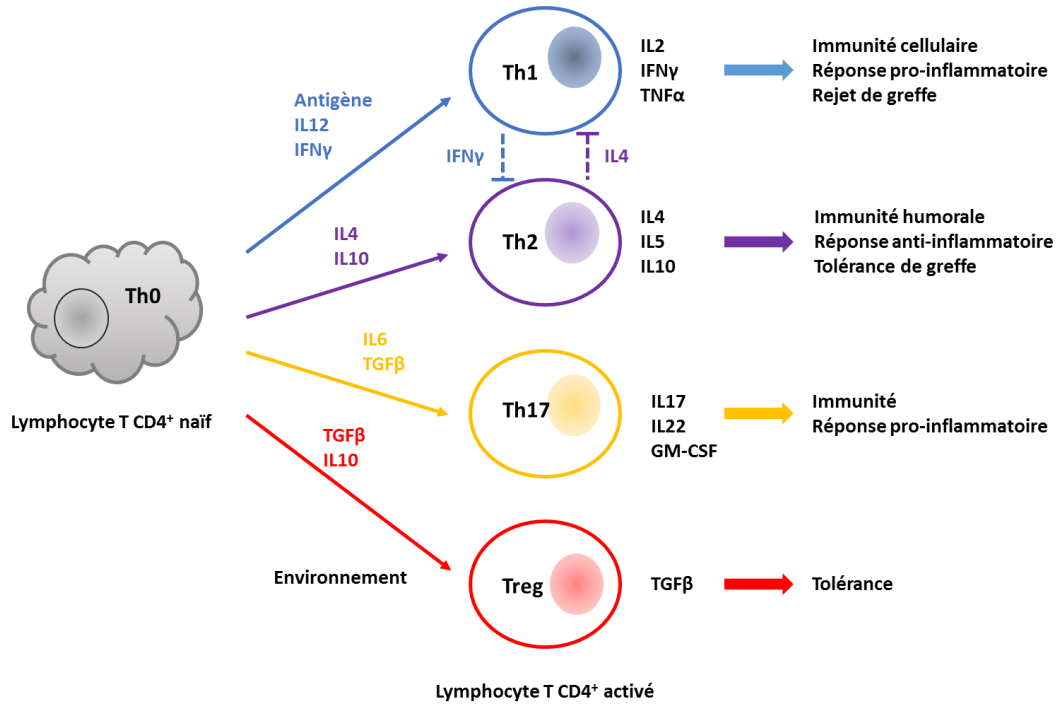


Figure 12: Voies de différenciation des lymphocytes T CD4+.

Les cellules T naïves Th0 se différencient vers quatre voies. Les voies Th1, Th2 et Th17 régulent l'immunité. La voie Treg régule la tolérance.

5) Fonction de barrière protectrice

Généralement le placenta revêt la fonction de barrière protectrice du fœtus contre des agents pathogènes et infectieux. Cependant, certains agents pathogènes sont capables de traverser la barrière placentaire. En fonction de l'agent pathogène, le placenta peut empêcher ou retarder l'infection du fœtus. Il peut également être le siège de l'infection virale. Lorsqu'il est le siège de l'infection, l'agent pathogène peut induire des conséquences sur le fœtus de manière directe ou indirecte *via* l'altération des fonctions placentaires. La perméabilité du placenta ainsi que la gravité des conséquences de l'infection sont dépendantes du stade de la grossesse. On différencie les agents pathogènes et virus transmis au fœtus au cours de la grossesse et de ceux transmis au moment de

l'accouchement. Ces différences et les conséquences de l'infection sur le fœtus sont présentées succinctement dans le Tableau 2.

Tableau 2: Principaux agents pathogènes capables d'infecter le fœtus au cours de la grossesse.

D'après Silasi et al, 2015 et Evain Brion, le placenta humain 2010.

Origine du vecteur	Pathologie	Manifestations
AGENT VIRAL	Rubéole	Potentiellement tératogène en début de grossesse. Syndrome malformatif dans 80 à 100 % des cas, si l'infection a lieu en début de grossesse. Atteintes de l'œil, du cœur et de l'oreille interne du fœtus.
	Varicelle	Entraîne des fœtopathies ou une varicelle néonatale sévère si l'infection a lieu entre la 13 ^{ème} et la 20 ^{ème} semaine de grossesse.
	Cytomégalovirus	L'infection à CMV est l'infection materno-foetale la plus fréquente. On dénombre 1500 infections congénitales par an. Parmi ces infections, 10 % des nouveau-nés présentent des infections périnatales sévères (retard de croissance intra-utérin, microcéphalie, hydrocéphalie, calcifications intra-crâniennes).
	Parvovirus B19	Infection à faible pouvoir tératogène. Généralement asymptomatique.
	Herpès génital	Transmission materno-foetale lors de l'accouchement. Une césarienne prophylactique et un traitement antiviral limitent le risque de transmission. L'herpès néonatal est donc très rare mais ses conséquences sont dramatiques (décès du nouveau-né, lourdes séquelles).
	VIH	Transmission materno-foetale inférieure à 2 % dans les pays industrialisés. Une césarienne prophylactique et un traitement antiviral limitent le risque de transmission. Transmission tardive essentiellement au moment de l'accouchement en absence de césarienne (65 %) ou dans les deux mois qui précèdent l'accouchement.
	Chikungunya	Transmission précoce, par le moustique <i>aedes</i> , rare mais grave et létale. Infection aux 2 ^{ème} et 3 ^{ème} trimestres de grossesse sans séquelle foetale.
	Dengue	Transmission materno-foetale par le moustique <i>aedes</i> . Faible innocuité pendant la grossesse, malgré la transmission materno-foetale avérée.
	Zika	Transmission materno-foetale par le moustique <i>aedes</i> . Cette infection est responsable de malformations congénitales sévères et d'une forte mortalité périnatale.
AGENT PARASITAIRE	Syphilis	La syphilis congénitale touche 8 % des nouveau-nés. Transmission essentiellement en fin de grossesse. Provoque 40 % de mort-périnatale si l'infection a eu lieu en début de 2 ^{ème} trimestre de grossesse.
	Listeria	La listeria est capable de traverser la barrière placentaire. Les transmissions en début de trimestre aboutissent à des fausses couches ou à des morts <i>in utéro</i> . Certains nouveau-nés peuvent être infectés et viables.
	Toxoplasmose	L'infection à <i>toxoplasma gondii</i> a lieu au 3 ^{ème} trimestre de la grossesse dans 50 % des cas. Les conséquences sont d'autant plus graves que l'infection a lieu précocement au cours de la grossesse.
	Paludisme	Le paludisme congénital aboutit à une augmentation de retard de croissance intra-utérin

Parmi tous les agents pathogènes susceptibles d'infecter le fœtus *via* une transmission placentaire, nous nous focaliserons sur le dernier exemple décrit dans la littérature et dans les médias, soit l'infection par le **virus Zika** (ZIKV). Comme le virus de la dengue, le ZIKV appartient à la famille des flavivirus et se transmet par l'intermédiaire d'un moustique. Répandu en Afrique et en Asie, il a récemment émergé en Amérique du Sud et en Amérique Centrale. En 2015 au Brésil, l'épidémie liée à ce virus est devenue un problème de santé publique. Bien que les symptômes induits par ZIKV soient souvent silencieux ou bénins chez l'adulte, il semblerait que sa transmission au fœtus au cours de la grossesse soit responsable de malformations congénitales sévères. Les mécanismes d'action de ZIKV dans l'infection des fœtus restent inconnus. Néanmoins, il a été montré que ce virus est capable de traverser la barrière placentaire. Un case report, publié dans la revue *New England Journal of Medicine* en 2016, décrit les conséquences d'une infection à ZIKV à la fin du 1^{er} trimestre de grossesse. L'autopsie, du fœtus mort *in utero*, montre une microcéphalie, associée à une hydrocéphalie. De plus, des calcifications du cerveau fœtal de petite taille et du placenta ont été observés (Mlakar et al., 2016). Une étude, réalisée sur des souris gestantes immunodépressives et infectées par ZIKV, a montré une augmentation significative de la mortalité *in utero*. Les quelques fœtus survivants présentaient un retard de croissance intra-utérin et des malformations majeures du tissu cérébral. Au cours de ce travail, les auteurs ont montré que les taux placentaires d'expression de ZIKV étaient 1000 fois supérieurs aux taux dosés dans le sérum maternel. Ceci suggère une réplication préférentielle de ZIKV dans le placenta. La présence de ZIKV dans les cellules trophoblastiques et les défauts de placentation observés, tels que l'angiogenèse perturbée, pourraient mettre en évidence un

effet indirect de ZIKV sur le développement embryonnaire *via* une altération du transport des nutriments et de l'O₂ au fœtus (Miner et al., 2016).

Chapitre II. Contrôle du développement placentaire

A- Invasion trophoblastique

L'invasion des trophoblastes extravilloux (CTEV) dans l'endomètre maternel est une étape essentielle au développement placentaire et fœtal. Entre la 8^{ème} et la 18^{ème} semaines de la grossesse, les CTEV situés à la base des villosités ancrées **acquièrent un phénotype invasif** et migrent dans la décidue maternelle (**invasion interstitielle**) ou de manière orientée vers les artères spiralées maternelles (**invasion endovasculaire**). L'invasion trophoblastique et le processus de cancérisation partagent de nombreuses similitudes, à la différence que l'invasion trophoblastique est extrêmement contrôlée dans le temps et dans l'espace. En effet l'invasion trophoblastique a lieu uniquement au cours du 1^{er} et du début du 2^{ème} trimestres de la grossesse. Elle n'excède pas le tiers supérieur du myomètre tandis que l'invasion tumorale est incontrôlable et ne respecte aucune limite tissulaire. Des altérations de ce processus d'invasion ont été associées à de nombreuses pathologies de la grossesse. En effet, un défaut de l'invasion trophoblastique est associé à des pathologies telles que la pré-éclampsie ou le retard de croissance intra-utérin. En revanche, un excès de l'invasion est associé à des placentas *accreta* (invasion au-delà du 1^{er} tiers supérieur du myomètre), *increta* (invasion profonde parfois dans la totalité du myomètre) ou *percreta* (invasion au-delà de l'utérus, susceptible d'atteindre les organes voisins). Un excès d'invasion peut

également conduire à des choriocarcinomes (tumeurs trophoblastiques gestationnelles). Les mécanismes précis de l'invasion trophoblastique sont très mal connus. Néanmoins, un certain nombre de facteurs impliqués dans la régulation de ce processus ont été décrits dans la littérature.

1) Facteurs d'adhésion et d'invasion trophoblastique

a) Facteurs d'adhésion : les cadhérines et les intégrines

L'invasion trophoblastique est précédée par une phase d'adhésion entre le trophoblaste et l'endomètre. Cette étape fait intervenir des facteurs d'adhésion exprimés à la surface des cellules trophoblastiques qui se lient à la matrice extracellulaire (MEC) endométriale. Parmi ces facteurs de reconnaissance cellulaire se trouvent les cadhérines et les intégrines.

Les **cadhérines sont des protéines de jonction cellule-cellule**. Ce sont des glycoprotéines transmembranaires avec un domaine extracellulaire constitué d'une répétition de 2 à 34 motifs de 110 acides aminés chacun. Les cadhérines décrites dans le placenta humain sont la cadhérine E (epithelial cadherin), la cadhérine VE (vascular endothelial cadherin) et la cadhérine 11. Dans les CTEV prolifératifs, la **cadhérine E** interagit avec le cytosquelette des cellules épithéliales endométriales, *via* la β -caténine, favorisant ainsi l'adhérence cellulaire. Dans les CTEV invasifs, l'expression de la cadhérine E diminue sensiblement. L'interaction entre la cadhérine E et la β -caténine est rompue, favorisant ainsi la migration des CTEV situés à la base des villosités crampons. Les CTEV invasifs expriment alors les cadhérines VE et 11.

L'expression de la **cadhérine VE est induite par le VEGF**. Cette cadhérine semble être plus spécifiquement impliquée dans le remodelage artériel utérin. Enfin, le rôle de la **cadhérine**

11 reste très peu connu. Elle est exprimée uniquement au début de la gestation et semble être impliquée dans la différenciation des CTV en ST. (Kokkinos et al., 2010; Harris et al., 2009; Zhou et al., 1997)

Les intégrines sont les **principaux médiateurs de la communication entre les cellules et leur environnement**. Ce sont des glycoprotéines hétérodimériques transmembranaires qui servent de récepteurs aux molécules de la MEC. La partie extracellulaire des intégrines forme un site de liaison reconnu par des protéines de la MEC possédant une séquence **consensus arginine-glycine-acide aspartique (RGD)**. Une intégrine correspond à l'association d'une sous-unité α et d'une sous-unité β par une liaison non covalente. On dénombre environ 18 sous-unités α et 8 sous-unités β différentes. Vingt-cinq intégrines distinctes ont été décrites. Elles se lient spécifiquement à une ou plusieurs protéines de la MEC. Par exemple, l'intégrine $\alpha\beta3$ est capable de se lier à de multiples cibles telles que la fibronectine, le fibrinogène, le facteur de Von Willebrand et certaines formes de collagène et de laminine. A l'inverse, l'intégrine $\alpha5\beta1$ se lie uniquement à la fibronectine. A l'interface foëto-maternelle, les intégrines sont exprimées à la fois dans les cellules déciduales et dans les cellules trophoblastiques. Au cours de la phase d'adhésion, l'endomètre exprime les sous-unités $\alpha1$ (du 15^{ème} jour au 28^{ème} jour du cycle) et $\alpha4$ (du 14^{ème} jour du cycle au 24^{ème} jour du cycle). La sous-unité $\beta3$ apparaît lors de la fenêtre d'implantation. La présence des sous-unités $\alpha\upsilon$ et $\beta1$ aboutit à l'expression des intégrines **$\alpha\upsilon\beta3$, $\alpha\upsilon\beta1$, $\alpha4\beta1$ et $\alpha1\beta1$** à la surface des cellules déciduales. L'intégrine **$\alpha\upsilon\beta3$ endométriale initie le contact et l'adhésion entre les cellules endométriales et les cellules trophoblastiques**. Cette intégrine $\alpha\upsilon\beta3$ est également exprimée par le trophoblaste. Il semble que l' $\alpha\upsilon\beta3$ trophoblastique reconnaisse l'ostéopontine endométriale tandis que l' $\alpha\upsilon\beta3$ endométriale interagisse avec la fibronectine

et la vitronectine exprimées par le trophoblaste. Lors de la phase d'adhésion, les intégrines $\alpha 6\beta 1$ et $\alpha 7\beta 1$ apparaissent à la surface du trophoblaste. Ces intégrines lient la laminine qui est exprimée en abondance à la surface de l'épithélium endométrial au cours de la fenêtre d'implantation. L'ensemble de ces interactions participe à l'ancrage du trophoblaste dans l'épithélium utérin (Merviel et al., 2001) (Figure 13).

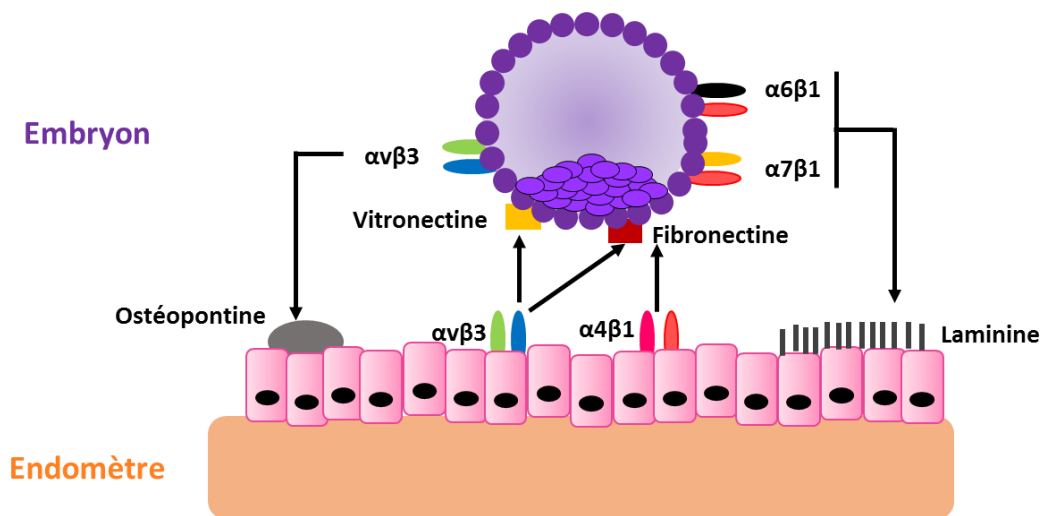


Figure 13: Interaction entre les intégrines trophoblastiques et endométriales au cours de la phase d'adhésion.

D'après Merviel, 2001. Les intégrines assurent les communications inter-cellulaires et entre les cellules et les éléments de la matrice extracellulaire (MEC). Chaque hétérodimère $\alpha\beta$ d'intégrine présente une spécificité de reconnaissance pour une ou plusieurs protéines de la MEC.

Un remaniement du répertoire d'expression des intégrines, à la surface des cellules trophoblastiques, est associé à l'acquisition du phénotype invasif des CTEV. En effet, les CTEV prolifératifs expriment majoritairement l'intégrine $\alpha 6\beta 4$. Cette intégrine est un récepteur de la laminine V. Les CTEV de la partie distale des colonnes, qui se différencient et acquièrent un phénotype invasif, présentent une diminution de l'expression des intégrines $\alpha 6\beta 4$ et une augmentation de l'expression des intégrines $\alpha 5\beta 1$ qui lient la fibronectine. Enfin, les CTEV invasifs les plus profonds dans l'endomètre, expriment les intégrines $\alpha \nu \beta 3$ et

$\alpha 1\beta 1$ qui lie le collagène et les laminines (abondantes dans la décidue). L'implication des intégrines $\alpha 1\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$ dans l'invasion trophoblastique a été démontrée par des approches *in vitro* (Damsky et al., 1994; Merviel et al., 2001). L'évolution de l'expression des intégrines est liée à une adaptation des CTEV aux différents composants de la MEC rencontrés au cours de leur migration dans l'endomètre maternel.

Enfin, les intégrines participent à l'invasion trophoblastique en régulant également l'activité d'enzymes protéolytiques qui dégradent la MEC telles que les protéases.

b) Facteurs de l'invasion : les protéases

Les **métalloprotéases, MMP**, sont des endopeptidases zinc dépendantes. Elles jouent un rôle crucial dans la progression tumorale et dans les phénomènes métastatiques. Il existe 23 MMP différentes identifiées chez l'Homme qui sont regroupées en cinq classes (Snoek-van Beurden and Von den Hoff, 2005). Le détail de la classification des MMP et de leurs substrats est présenté dans le Tableau 3.

Les MMP sont généralement produites sous forme de pro-enzymes (pro-MMP) dont l'activation fait suite au clivage du domaine pro-peptide. L'activation des MMP est souvent induite par d'autres MMP ou par des sérines protéases telles que l'urokinase plasminogen activator (uPA). L'activité des MMP est principalement régulée par les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (TIMP). Il existe quatre types de TIMP (1-4). Les TIMP inhibent les MMP de manière stœchiométrique par la formation de complexe 1:1. Les MMP sont décrites pour leur capacité à réguler le remodelage physiologique de la MEC. Néanmoins, elles sont également impliquées dans le contrôle i) du développement embryonnaire, ii) de la morphogénèse, iii) de la synthèse de cytokines et iv) de la réponse immunitaire. Les MMP

sont impliquées dans l'apparition de pathologies associées à des altérations de la réponse immunitaire et à un excès de la dégradation de la MEC, telles que les maladies auto-immunes ou le processus métastatique (Brown and Murray, 2015; Khokha et al., 2013).

Les premières MMP clonées et caractérisées sont les gélatinases MMP-2 et MMP-9. L'implication des **MMP-2 et MMP-9** dans la fonction de reproduction a été très largement décrite dans la littérature. Ce sont les **enzymes clés de l'invasion trophoblastique**. La MMP-2 est sécrétée par l'embryon à partir du stade de blastocyste. La MMP-2 est la gélatinase la plus exprimée dans le placenta de 1^{er} trimestre précoce (entre la 6^{ème} et la 8^{ème} semaine de grossesse) tandis que la MMP-9 devient dominante à la fin du 1^{er} trimestre de grossesse (entre la 9^{ème} et 12^{ème} semaine de grossesse). Les MMP-2 et MMP-9 sont très exprimées dans les CTEV invasifs. Elles favorisent la dégradation du collagène IV qui est le composant principal des membranes basales. Elles facilitent ainsi la migration et l'invasion des CTEV au sein de la décidue (Staun-Ram and Shalev, 2005; Staun-Ram et al., 2004). L'activité des MMP est contrôlée principalement par les **TIMP**. TIMP-1 se lie préférentiellement à la MMP-9 tandis que TIMP-2 se lie majoritairement à la MMP-2. A noter, que les TIMP-1, 2 et 3 sont exprimés par les CTEV et les cellules endométriales, suggérant ainsi un contrôle autocrine et paracrine de l'activité des MMP (Graham and Lala, 1991). Plusieurs travaux réalisés *in vitro* ont clairement démontré l'importance de la balance MMP/TIMP dans la régulation de l'invasion trophoblastique. En effet, l'ajout de TIMP ou l'inhibition des MMP induit une diminution des capacités invasives des CTEV maintenus en culture (Isaka et al., 2003; Librach et al., 1991).

Tableau 3: Classification, nomenclature et substrats des métalloprotéases.

D'après Brown, 2015 et Snoek-van Beurden, 2005.

Sous famille	MMP	Substrats
Gélatinases	MMP-2	Gélatine, collagène I, II, III, IV, VII, X
	MMP-9	Gélatine, collagène IV, V
Collagenases	MMP-1	Collagène I, II, III, VII, VIII, X, gélatine
	MMP-8	Collagène I, II, III, VII, VIII, X, agrégane, gélatine
	MMP-13	Collagène I, II, III, IV, IX, X, XIV, gélatine
Stromelysines	MMP-3	Collagène II, IV, IX, X, XI, gélatine
	MMP-10	Collagène IV, laminine, fibronectine, élastine
	MMP-11	Collagène IV, fibronectine, laminine, agrégane
Matrilysines	MMP-7	Fibronectine, laminine, collagène IV, gélatine
	MMP-26	Fibrinogène, fibronectine, gélatine
Membranes types	MMP-14	Gélatine, fibronectine, laminine
	MMP-15	Gélatine, fibronectine, laminine
	MMP-16	Gélatine, fibronectine, laminine
	MMP-17	Fibrinogène, fibrine
	MMP-24	Gélatine, fibronectine, laminine
	MMP-25	Gélatine
MMP non classées	MMP-12, 19, 20, 21, 22, 23, 27 et 28	Elastine, fibronectine, collagène IV, agrégane, élastine, fibrilline, gélatine et substrats inconnus

Plusieurs autres protéases participent à l'invasion trophoblastique. Parmi elles, le système de l'**urokinase plasminogen activator (uPA)**. Ce système comprend l'uPA, le récepteur à l'uPA (uPAR) et deux inhibiteurs majeurs de l'uPA (PAI-1 et PAI-2). Ces sérines protéases favorisent l'invasion des CTEV de manière directe en dégradant la MEC et de manière indirecte en activant la MMP-9 (Martínez-Hernández et al., 2011). L'inhibiteur de l'activateur du plasminogène PAI-1 prévient l'activation excessive des MMP (Bauer et al., 2004).

Les **A Disintegrin And Metalloproteinase ou ADAM** forment une classe de protéases récemment identifiée. On dénombre 21 ADAM différentes chez l'Homme. Ces enzymes à activité protéolytique sont impliquées dans des processus physiologiques variés tels que la fécondation, le développement embryonnaire mais également dans des pathologies telles que la maladie d'Alzheimer ou la cancérisation (Murphy, 2008). L'**ADAM12** est la plus

étudiée dans le placenta humain. En effet, elle est très exprimée dans le placenta humain et elle semble être associée à des pathologies de la grossesse. L'ADAM12 existe sous deux formes. Une forme longue, transmembranaire appelée ADAM12L et une forme courte et soluble appelée ADAM12S. Comme les MMP, les ADAM sont sécrétées sous une forme inactive. Le clivage de leur pro-domaine est nécessaire à leur activation. Il a été montré que l'ADAM12L fixe l'héparin-binding EGF-like growth factor (HBEGF). L'HBEGF est exprimé par les CTEV et est impliqué dans l'initiation de la migration et de l'invasion trophoblastique. Des immunomarquages de placentas de 1^{er} trimestre ont mis en évidence une expression de l'ADAM12 dans les CTEV invasifs principalement et, de manière moindre, dans le ST. Plusieurs études menées *in vitro*, ont clairement mis en évidence l'effet pro-invasif de l'ADAM12 sur les CTEV (Aghababaei et al., 2014; Biadasiewicz et al., 2014). Les principaux acteurs de l'invasion trophoblastique sont résumés dans la figure 14.

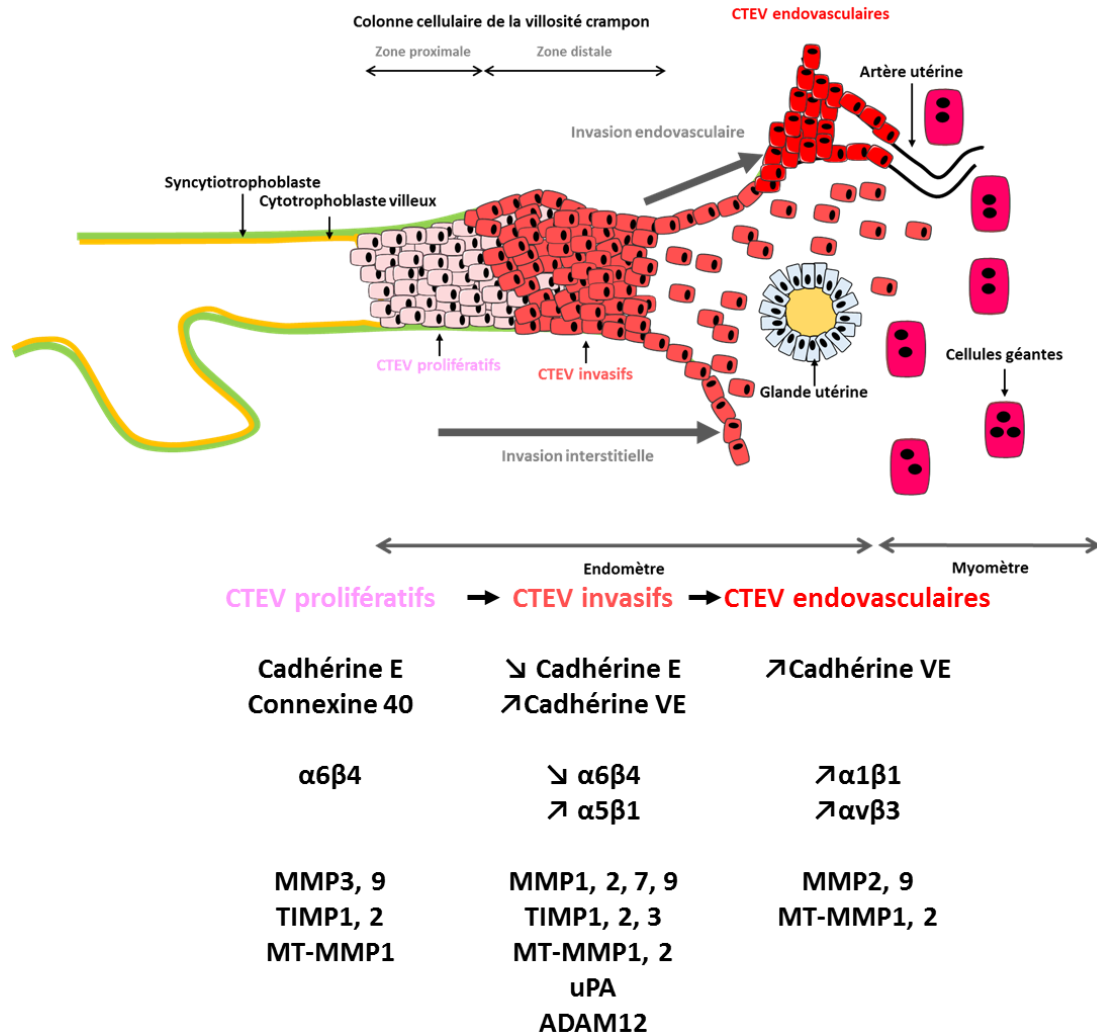


Figure 14: Les acteurs de l'invasion trophoblastique.

L'invasion trophoblastique implique la transition des CTEV présentant un phénotype épithélial vers un phénotype mésenchymateux. Cette transition est assurée par l'expression de facteurs d'adhésion spécifiques. L'expression des protéases et des inhibiteurs des protéases permet de contrôler spatialement et temporellement l'invasion trophoblastique.

2) Régulation de l'invasion trophoblastique par les facteurs diffusibles

Le contrôle de l'invasion trophoblastique fait intervenir divers facteurs trophoblastiques et/ou endométriaux qui agissent de manière auto/para et endocrine. Ces facteurs régulent principalement l'expression, l'activation et la sécrétion des protéases. De plus, ces facteurs régulent de manière spatio-temporelle la différenciation progressive des CTEV vers un phénotype invasif.

a) Les hormones placentaires

La progestérone (Pg). La Pg freine l'invasion trophoblastique en inhibant l'expression des MMP. En effet, plusieurs études réalisées *in vitro*, ont montré que la Pg i) inhibe la sécrétion de la MMP-9 dans les CTEV maintenus en culture primaire, ii) inhibe l'activité des MMP-9 et MMP-2 des cellules trophoblastiques immortalisées HTR-8/SVneo et iii) stimule l'expression de l'inhibiteur tissulaire des métalloprotéases 3 (TIMP-3) dans les cellules stromales endométriales (Halasz and Szekeres-Bartho, 2013). La Pg agit de manière directe en inhibant l'expression transcriptionnelle des MMP. Plus précisément, elle inhibe l'expression de la MMP-2 en bloquant la fixation du facteur de transcription SP4 sur la région promotrice de MMP-2 (Goldman et al., 2009). La Pg inhibe également l'expression de la MMP-9 notamment en bloquant l'entrée dans le noyau du facteur de transcription NF- κ B. De plus, il a été montré que la Pg contrôle négativement l'invasion en augmentant l'expression de TIMP-1. Enfin, la Pg favorise l'expression du PIBF (progesterone induced blocking factor) qui bloque les effets pro-invasifs de la leptine et de l'IL1 α (Halasz and Szekeres-Bartho, 2013; Halasz et al., 2013).

L'hormone chorionique gonadotrope humaine (hCG). Après plusieurs études contradictoires, il est aujourd'hui bien établi que l'hCG produite par le ST n'exerce pas

d'effet sur l'invasion trophoblastique. Néanmoins, l'**hCG hyperglycosylée (hCG-H)** qui est sécrétée par les CTEV invasifs uniquement a été décrite comme une hormone pro-invasive. En effet, le traitement des cellules de la lignée JEG-3 ou de la lignée HIPEC65 avec de l'hCG-H stimule l'invasion trophoblastique. De plus, le traitement par l'hCG-H induit une augmentation de l'activité des MMP-2 et MMP-9 (Lee et al., 2013; Handschuh et al., 2007). Le récepteur de l'hCG-H n'est actuellement pas identifié. Des études suggèrent que les effets de l'hCG-H seraient médiés par le récepteur du TGF β . Le TGF- β est décrit comme un régulateur négatif de l'invasion *via* l'inhibition de la sécrétion de MMP. Ainsi, par un effet antagoniste sur les récepteurs au TGF- β , l'hCG favoriserait l'invasion (Evans, 2016; Cole, 2010).

La **Gonadotrophin-releasing hormone (GnRH)** est une hormone produite par les neurones hypothalamiques sécrétoires. Ce décapeptide est un régulateur majeur de la fonction de reproduction. En effet, elle stimule la biosynthèse de la LH et de la FSH, hormones essentielles à la stéroïdogenèse et à la gamétogenèse. Elle favorise également l'expression de la sous-unité β de l'hCG. La **GnRHI** est la forme classiquement retrouvée chez les mammifères. Néanmoins, on distingue une seconde forme, la **GnRHII**, qui diffère de la GnRHI par trois acides aminés. La GnRHI est exprimée dans le placenta humain tout au long de la grossesse. Elle est détectée dans le ST, les CTV et les CTEV. La GnRHII est exprimée dans le placenta uniquement au 1^{er} trimestre de la grossesse. Elle est localisée dans les CTV et les CTEV. Cette évolution de l'expression des GnRH au cours de la grossesse suggère un rôle important de la GnRH dans la régulation du pouvoir invasif des trophoblastes. Plusieurs travaux réalisés *in vitro* ont montré que la GnRH stimule l'expression de la MMP-9, de la MMP-2 et de l'uPA. En revanche, la GnRH inhibe l'expression de TIMP-1 et de la PAI-1 (Chou

et al., 2003, 2004). Dans les cellules trophoblastiques, la GnRH induit ses effets *via* les récepteurs classiques de la GnRH, les **GnRHR**, qui empruntent les voies PKC et MAPK. La GnRHII exerce ses effets *via* les GnRHR mais également *via* le récepteur à l'épidermal growth factor (EGFR). L'usage d'antagonistes sélectifs de ces deux GnRH a permis de mettre en évidence qu'elles favorisent toutes les deux l'invasion trophoblastique en empruntant des récepteurs et voies de signalisation distinctes (Liu et al., 2009).

Les **kisspeptines** (Kp) sont des neuropeptides qui participent à la fonction de reproduction. Elles sont codées par le gène Kiss1 et se fixent aux récepteurs spécifiques Kiss1R. Il a été montré que l'expression des Kp est restreinte au ST tandis que les Kiss1R sont présents dans le ST, le CTV et le CTEV. Ceci suggère une régulation paracrine des Kp sur la différenciation des trophoblastes. Il a été montré, *in vitro*, que la Kp10 inhibe l'invasion trophoblastique en diminuant l'activité protéolytique de la MMP-2 dans des explants et des cultures primaires de placenta humain (Hiden et al., 2007). Des études récentes ont mis en évidence que Kp-10 inhibe l'expression transcriptionnelle des MMP-2 et MMP-9 dans des cellules HTR-8/SVneo. De plus, les Kp inhibent le remodelage artériel utérin, notamment en inhibant le VEGF-A, un régulateur négatif de l'angiogenèse (Francis et al., 2014).

b) Les facteurs de croissance

L'épidermal growth factor (EGF) est produit par le trophoblaste et par les cellules endométriales. Une étude, réalisée sur des cellules trophoblastiques HTR-8/SVneo, a montré que l'EGF induit une augmentation de l'expression de MMP-9 et de TIMP-1. Cet effet est associé à l'activation des voies de signalisation MAPK et PI3K/Akt (Qiu et al., 2004). Plusieurs travaux ont tenté de mettre en évidence les mécanismes moléculaires empruntés par l'EGF pour exercer son effet pro-invasif. Il semble que l'EGF sécrété par les cellules déciduales

inhibe l'expression de la connexine 40 (Wright et al., 2006). La connexine 40 est un composant des jonctions communicantes. Elle est exprimée uniquement dans les CTEV prolifératifs situés à la base des villosités ancrées. Elle favorise la prolifération des CTEV et inhibe leur différenciation. Une inhibition de l'expression de la connexine 40 dans les CTEV est nécessaire à la transition du phénotype prolifératif vers le phénotype invasif (Winterhager and Kidder, 2015; Nishimura et al., 2004). Enfin, des études récentes ont montré que l'EGF favorise l'invasion trophoblastique en stimulant l'expression des facteurs de transcription FoxM1 et de STAT 5 (Xie et al., 2015; Ospina-Prieto et al., 2015).

Le **vascular endothelial growth factor (VEGF)** est un facteur de croissance pro-angiogénique, indispensable à la prolifération trophoblastique et au bon déroulement de la placentation. Des études réalisées *in vitro* indiquent que le VEGF stimule l'uPA. Ceci suggère un rôle positif du VEGF sur l'invasion trophoblastique (Anteby et al., 2004). Néanmoins, d'autres études remettent en cause cet effet pro-invasif du VEGF (Athassiades et al., 1998).

L'**endocrine-gland-derived vascular endothelial growth factor (EG-VEGF)** aussi appelé **prokinéticine (PROK)** est un facteur pro-angiogénique sécrété par les glandes utérines mais également par le placenta. Les PROK exercent leurs effets *via* les récepteurs PROK1R et PROK2R, couplés aux protéines G, qui sont exprimés dans le placenta humain. Cette famille de peptides est constituée de trois membres, PROK1, PROK2 et PROK2L. PROK1 est la seule forme exprimée dans le placenta humain. Elle présente un pic d'expression très peu de temps avant la mise en route de la circulation foëto-maternelle. Il a été montré que l'expression de PROK1 est augmentée en condition hypoxique. Deux études récentes montrent que PROK1 est un régulateur négatif de l'invasion trophoblastique capable

d'inhiber l'expression des MMP-2 et MMP-9 dans les cellules de la lignée HTR-8/SVneo (Alfaidy, 2016; Hoffmann et al., 2009).

Le **Transforming Growth Factor β (TGF β)** est également un régulateur négatif de l'invasion trophoblastique. La famille du TGF β est composée de trois membres, le TGF β 1, le TGF β 2 et le TGF β 3. Ces trois formes sont exprimées dans le placenta humain. Le TGF β 1 est la forme la plus abondante. Le TGF β -1 est localisé à la base des villosités choriales, mais il n'est pas exprimé dans les CTEV invasifs (Lash et al., 2005). Il est bien décrit dans la littérature que le TGF β favorise la progression de cancer et le phénomène de métastase. Cependant, plusieurs études ont montré que le TGF β favorise la sécrétion de TIMP-1 et inhibe l'expression des protéases MMP-9/2 et uPA dans des explants placentaires maintenus en survie (Yang et al., 2009; Lash et al., 2005; Graham and Lala, 1991).

c) Les cytokines et interleukines

Le **leukemia inhibitory factor (LIF)** appartient à la famille de l'interleukine 6. Il est exprimé dans les cellules endométriales (cellules épithéliales et glandulaires) et dans les cellules trophoblastiques (CTV et CTEV) (Sharkey et al., 1999). L'extinction de l'expression du LIF chez des souris gestantes induit des altérations de la placentation qui aboutissent à des fausses-couches (Stewart et al., 1992). Plus précisément, le LIF est un facteur qui favorise l'invasion trophoblastique. Cet effet pro-invasif est associé à un contrôle positif de l'expression de l'intégrine β 3 et de la SERPINB3. De plus, le LIF inhibe l'expression des TIMP et favorise l'expression de la **pappalysine 1 (PAPPA1)**, une métalloprotéase récemment identifiée, qui dégrade les éléments de la MEC endométriale. Les effets pro-invasifs du LIF sont médiés par les voies JAK/STAT et MAPK (Suman et al., 2013).

Plusieurs autres interleukines interviennent dans la régulation de l'invasion trophoblastique. Par exemple, il a été montré que l'IL1 β , l'IL6 et l'IL8 exercent un effet positif sur l'invasion des CTEV notamment en favorisant l'expression de la MMP-9 (Prutsch et al., 2012; Jovanović and Vićovac, 2009; Jovanović et al., 2010). En revanche, l'IL10 et IL11 exercent un effet opposé en inhibant l'expression des MMP (Paiva et al., 2009; Pang et al., 2008).

d) L'human leukocyte antigen G

L'human leukocyte antigen (HLA)-G est un antigène non classique du complexe d'histocompatibilité, exprimé uniquement à la surface des CTEV. L'expression de l'HLA-G est associée à l'acquisition d'un phénotype invasif. En effet, *in vivo*, l'expression de l'HLA-G est maximale au 1^{er} trimestre de la grossesse quand les CTEV ont un pouvoir invasif élevé. La différenciation, *in vitro*, des CTEV prolifératifs en CTEV invasifs s'accompagne d'une augmentation de l'expression de l'HLA-G (McMaster et al., 1995). Il est actuellement admis que l'expression d'HLA-G est un marqueur du caractère invasif des cellules trophoblastiques en particulier et des cellules cancéreuses en général. Les CTEV sécrètent également une forme soluble d'HLA-G (sHLA-G). Une étude, réalisée *in vitro*, a montré que le sHLA-G régule l'immunos tolérance et l'invasion trophoblastique (Guo et al., 2013; McCormick et al., 2009). L'ensemble des facteurs régulateurs de l'invasion trophoblastique est résumé dans le Tableau 5.

3) Régulation de l'invasion trophoblastique par les facteurs transcriptionnels

a) Les micro-ARN

Les micro-ARN sont des petits ARNs non codants de 21 à 25 nucléotides qui régulent de manière post-transcriptionnelle environ 30 % des gènes humains. Découverts en 1993, le nombre de mi-ARN identifiés chez l'Homme ne cesse d'augmenter. Actuellement, on estime qu'il existe entre 1000 et 2000 mi-ARN dans l'espèce humaine. Les mi-ARN régulent de nombreux processus cellulaires tels que la différenciation, la prolifération, la migration cellulaire et l'apoptose. L'étude du répertoire des mi-ARN (miRnome) de placentas de 1^{er} et 3^{ème} trimestre a mis en évidence environ 300 mi-ARN spécifiques. Ces mi-ARN sont, pour la grande majorité, codés par des clusters de gènes localisés sur les chromosomes 19 (C19MC et miR-371-3) et sur le chromosome 14 (C14MC). Le cluster C19MC est spécifique des primates et il est exprimé uniquement dans le placenta (Morales-Prieto et al., 2013). L'impact des mi-ARN dans le développement placentaire est clairement établi. En effet, la mutation du gène murin codant pour un acteur essentiel de la machinerie de production des mi-ARN, la protéine Ago2, aboutit à des malformations placentaires et à une forte létalité fœtale (Cheloufi et al., 2010). Les études fonctionnelles, menées *in vitro* sur des cellules trophoblastiques en culture primaire ou issues de lignées immortalisées, ont permis de mettre en évidence de nombreux mi-ARN potentiellement impliqués dans l'invasion trophoblastique et la placentation. Les mi-ARN les plus décrits dans la littérature ont été résumés dans le Tableau 4.

Tableau 4: Gènes cibles et fonctions des mi-ARN dans les cellules trophoblastiques humaines.

D'après Chen et al, 2013 et Morales-Prieto et al, 2012.

mi-ARN	Gène cible	Trophoblaste	Fonctions dans le trophoblaste
miR-152	HLA-G	JEG-3	⊘ HLA-G. ↗ cytolyse par les NK
miR-34a	Notch1, Jagged1, PAI-1	JAR	⊘ invasion
miR-17, 20a et 20b	VEGF, MMP-2, HIF, ephrin B4 and B2	HUVEC, BeWo	⊘ Différenciation des CT, invasion, angiogénèse
miR-210	HOXA9	Swan 71, CTEV	⊘ invasion
miR-205	Mediator1	CTEV, HTR-8/SVneo	⊘ Différenciation des CT
miR-155	Cyclin D1	HTR-8/SVneo	⊘ prolifération, invasion des CTEV
miR-195	Activin receptor II	HTR-8/SVneo	⊘ invasion
miR-376c	TGF-β receptor ALK5, ALK7	HTR-8/SVneo, explant	↗ prolifération, migration, invasion
miR-21	Phosphatase tensin homolog (PTEN), programmed cell death 4 (PDCD4)	HTR-8/SVneo, JEG-3	↗ prolifération, invasion
miR-135	CXCL12	HTR-8/SVneo	⊘ invasion
miR-204	MMP-9	JEG-3, BeWo	⊘ invasion
miR-141	Ephrin a3, VEGF-A, iron-sulfur cluster scaffold homologue (ISCU)	HTR-8/SVneo	↗ prolifération, invasion

Le miR-210 est un hypoxamiR (hypoxia inducible microRNA) dont l'expression est induite par le facteur de transcription HIF-1 α . Il fait partie des mi-ARN les plus exprimés dans les cellules trophoblastiques. Il a été montré que miR-210 inhibe l'invasion trophoblastique et favorise l'angiogénèse au cours de la placentation (Anton et al., 2013). Des analyses bio-informatiques puis fonctionnelles ont montré que ce mi-ARN régule des gènes impliqués dans le métabolisme mitochondrial, dans l'angiogénèse, dans la réparation de l'ADN et dans l'invasion cellulaire. Tous ces processus sont impliqués dans la physiopathologie de la pré-éclampsie (Li et al., 2014).

b) Les facteurs de transcription

Le programme de différenciation des CTEV d'un phénotype épithélial (prolifératif) vers un phénotype mésenchymateux (invasif) fait intervenir plusieurs dizaines de facteurs de transcription ubiquitaires.

La **pression en oxygène** à l'interface foëto-maternelle est cruciale dans le développement placentaire. En effet, les premières étapes du développement du foetus sont réalisées en condition d'hypoxie relative. Il est important de noter que cette « hypoxie » du placenta de 1^{er} trimestre de grossesse est un environnement physiologique nécessaire au bon développement de cet organe. A partir de la 10^{ème} semaine de grossesse, une transition progressive s'opère vers un environnement normoxique (Huppertz et al., 2014). Cette transition fait intervenir une famille de facteurs de transcription sensibles à l'oxygène : **les hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1)**. Les HIF-1 ont d'abord été décrits pour leur fonction de régulateur clé de l'expression d'érythropoïétine (EPO). Les HIF sont composés des sous-unités α (HIF-1 α) et β (HIF-1 β). HIF-1 β est exprimé de manière constitutive tandis que l'expression de HIF-1 α est régulée par l'oxygène. En condition normoxique, HIF-1 α est reconnue par une ubiquitine ligase VHL (von Hippel-Lindau) qui adresse l'HIF-1 α au protéasome pour être dégradée. En revanche, dans un environnement pauvre en oxygène, l'expression d'HIF-1 α est augmentée. Les HIF-1 régulent l'expression de leurs gènes cibles en se liant à un élément de réponse à l'hypoxie (HRE). De manière générale, les HIF-1 régulent l'expression de gènes impliqués dans l'érythropoïèse, l'angiogenèse, la prolifération cellulaire, l'apoptose et le métabolisme glucidique (Highet et al., 2015). Les HIF-1 sont des acteurs clés du développement placentaire précoce. L'arrivée de l'oxygène au début du 2^{ème}

trimestre de grossesse induit une chute brutale de l'expression d'HIF-1 α . La différenciation des CTEV en cellules invasives est alors observée (Genbacev et al., 1997).

Le facteur de transcription **wingless (Wnt)-associated T-cell factor-4 (TCF-4)** favorise la migration et l'invasion trophoblastique. En effet, une étude récente a montré que la liaison de ligands de la famille Wnt sur leurs récepteurs spécifiques Frizzled, induit une stabilisation de la β -caténine cytosolique. Ainsi, le recrutement nucléaire de TCF-4 qui se lie à la β -caténine est permis. Ce complexe transcriptionnel augmente l'expression des intégrines $\alpha 1$ et $\alpha 5$, de Snail, une protéine présente dans les jonctions serrées, et de Notch 2. Ainsi, la différenciation des cytotrophoblastes en CTEV invasifs est stimulée (Meinhardt et al., 2014).

Les **Id (inhibitor of DNA binding)** sont des protéines qui se lient à des facteurs de transcription de type hélice-boucle-hélice. Chez l'Homme, il existe quatre Id différentes (Id1, Id2, Id3 et Id4). Dans le placenta humain, l'Id3 est exprimée de manière constitutive tandis que l'expression de l'**Id2** diminue en fonction de l'état de différenciation trophoblastique. La stabilisation, *in vitro*, de l'Id2 dans des cellules trophoblastiques induit i) le maintien d'un état indifférencié, ii) une faible expression de l'intégrine $\alpha 1$ et iii) une inhibition partielle de l'invasion trophoblastique. Ces observations suggèrent que l'Id2 et les facteurs de transcriptions de type hélice-boucle-hélice jouent un rôle important dans la différenciation et l'invasion trophoblastique (Janatpour et al., 2000).

Le facteur de transcription **Activating protein 2 (AP-2)** est surtout décrit pour sa capacité à stimuler la production d'hCG par le ST. Néanmoins, il a été montré que ce facteur est exprimé dans les CTEV où il favorise l'invasion trophoblastique de manière dépendante de l'EGF. En effet, l'EGF stimule l'expression de l'AP-2. De plus, l'inhibition de l'expression l'AP-2, par des ARN interférents, aboutit à une diminution partielle de l'effet pro-invasif induit

par l'EGF sur les cellules trophoblastiques extravilleuses HTR-8/SVneo et SGHPL-5 (Biadasiewicz et al., 2011).

Le facteur de transcription **Peroxisome proliferator activator receptor γ (PPAR γ)** est exprimé dans le noyau des CTV tout au long de la grossesse et dans les CTEV uniquement au cours du 1^{er} trimestre de grossesse. Il a été montré que l'ajout de rosiglitazone, un agoniste de PPAR γ , inhibe les capacités invasives des CTEV (Tarrade et al., 2001b). Une étude transcriptomique a montré que l'effet anti-invasif de PPAR γ est lié au contrôle de l'expression de gènes clés de l'invasion cellulaire tels que l'ADAM12, la PAPPA2, la PAI-1 et les connexines 40 et 43. Cette étude a également montré que PPAR γ stimule l'expression des lysyl oxidasases qui sont des régulateurs négatifs de l'invasion cellulaire (Segond et al., 2013).

Le facteur de transcription **Storkhead box 1 (STOX1)** semble réguler l'invasion trophoblastique. En effet, une étude réalisée *in vitro* et *in vivo* a permis de mettre en évidence que la mutation Y153H de l'isoforme A de STOX1 inhibe la différenciation des CTEV vers un phénotype invasif en activant la protéine d'adhésion alpha T-catenin (CTNNA3 (van Dijk et al., 2010). Cet effet anti-invasif semble être plus important avec la forme 153H de STOX1 par comparaison avec la forme 153Y, suggérant ainsi que ce polymorphisme aboutit à un gain de fonction pour la protéine STOX1.

4) Les voies de signalisation de l'invasion trophoblastique

L'invasion trophoblastique est donc régulée par des facteurs multiples et variés. En fonction de leur nature, ces régulateurs de l'invasion activent différentes voies de signalisation. Les voies de signalisation cellulaires sont généralement dépendantes de protéines kinases et par

conséquent de réactions de phosphorylation. En fonction des stimuli, diverses cascades de phosphorylation seront activées *via* des récepteurs à activité « tyrosine kinase » (RTK), des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), des intégrines ou autres récepteurs. Il a été montré que les voies mitogen-activated protein kinases (MAPK), phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-Akt, Janus kinase (JAK)-signal transducers and activators of transcription (STAT), focal adhesion kinase (FAK) participent plus particulièrement au contrôle de l'invasion trophoblastique.

a) La voie mitogen-activated protein kinases (MAPK)

Les voies MAPK sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires, tels que la prolifération, la différenciation, le développement, et la survie cellulaire. Cette voie est anormalement activée dans de nombreux cas de cancer. La voie MAPK est activée par des cytokines ou des facteurs de croissance qui se lient à un RTK. Suite à cette liaison, les protéines Grb-2 (growth factor receptor bound protein 2) et SHP2 (Src homology 2 domain containing tyrosine phosphatases) sont recrutées. Elles activent alors les enzymes Ras et Raf qui initient la cascade de phosphorylation. Ces enzymes phosphorylent la MAPK kinase kinase (MEK) qui active les trois membres de la famille des MAPK, soit les **extracellular signal-regulated kinases** (ERK), les **c-Jun N-terminal kinases** (JNK) et les **p38MAPK** (Kyriakis and Avruch, 2012). Il a été montré que les ERK sont exprimées dans le CTEV. De plus, l'activation des ERK par les facteurs endométriaux tels que le LIF, l'IGF2 ou l'IGFBP favorise la migration des HTR-8/SVneo. L'hCG-H et l'EGF favorisent l'expression des MMP-2 et MMP9 *via* la voie des MAPK. En revanche, la p38MAPK n'est pas exprimée dans les CTEV. Il semblerait que ce membre des MAPK n'intervienne pas dans la migration des CTEV. L'implication de la JNK dans la migration et l'invasion des CETV n'a pas été étudiée (Knofler,

2010). L'ensemble de ces observations laisse à penser que la voie des MAPK est une voie essentielle au contrôle du processus invasif.

b) La voie phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-Akt

La voie PI3K est impliquée dans la croissance, la prolifération, la migration et la survie cellulaire. Cette voie est activée par des ligands qui se lient préférentiellement à des RTK. Le récepteur activé en présence de ligand recrute les deux sous-unités de la PI3K, les protéines p85 et p110. La PI3K activée phosphoryle alors le phosphatidylinositol-4, 5-bis-phosphate (PIP2) qui est converti en PIP3. L'augmentation de la concentration de PIP3 induit le recrutement et l'activation de l'Akt qui active une cible majeure de la voie PI3K, le mammalian target of rapamycin (mTOR). Il semble que la voie PI3K/Akt favorise la migration trophoblastique. En effet, l'inactivation de cette voie, dans les cellules trophoblastiques HTR-8/SVneo, inhibe les actions pro-invasives de l'EGF et de l'IGF (Qiu et al., 2004). Un activateur de la voie PI3K, le peptide 740Y-P, induit une augmentation de l'invasion des cellules trophoblastiques SGHPL-5. L'hCG-H, l'EGF et l'hépatocyte growth factor HGF favorisent tous les trois l'invasion trophoblastique *via* la voie PI3K. Plusieurs facteurs de croissance favorisent la migration des cellules *via* les voies MAPK et PI3K. Ceci suggère un effet positif, synergique de ces deux voies de signalisation sur la migration des CTEV (Knofler, 2010).

c) La voie Janus kinase (JAK)-signal transducers and activators of transcription (STAT)

La voie JAK-STAT régule la prolifération, la différenciation, la migration cellulaire mais également l'immunité. Cette voie est activée par des cytokines et des facteurs de croissance qui se lient à un récepteur transmembranaire. La liaison du ligand au récepteur induit sa dimérisation puis son activation par phosphorylation. Les protéines JAK, associées au

domaine cytoplasmique de récepteur, phosphorylent des résidus tyrosines qui deviennent des sites de liaison pour les protéines STAT. Ainsi, les STAT initialement présentes dans le cytoplasme sont relocalisées dans la membrane plasmique. Les STAT, activées par phosphorylation grâce aux JAK, forment des dimères et migrent dans le noyau. Après liaison à des séquences d'ADN régulatrices, elles régulent l'expression de leurs gènes cibles. La protéine STAT3 semble jouer un rôle crucial dans la placentation humaine. En effet, elle est exprimée uniquement dans les trophoblastes de 1^{er} trimestre, ce qui suggère une implication de STAT3 dans les étapes précoces du développement. L'extinction du gène codant pour STAT3, chez des souris gestantes, aboutit à une létalité au 7,5^{ème} jour du développement embryonnaire (Stewart et al., 1992). Des études, menées *in vitro*, ont montré que l'inhibition de l'expression de STAT3 par des ARN interférents, induit une diminution de l'invasion des cellules JEG-3 (Fitzgerald et al., 2010). Plusieurs facteurs de croissance, tels que le LIF, l'IL6, IL11, l'HGF, le GM-CSF et l'IGF2 régulent l'invasion trophoblastique *via* la protéine STAT3 (Fitzgerald et al., 2005; Poehlmann et al., 2005). La protéine STAT5 est également décrite comme un facteur de transcription régulant la migration des trophoblastes. En effet, le rôle pro-invasif de l'human placental growth hormone (hPGH) et de l'EGF passe par la protéine STAT5 (Ospina-Prieto et al., 2015; Lacroix et al., 2005). De manière générale, la voie JAK-STAT favorise la migration et l'invasion des CTEV.

d) La voie Wingless (Wnt)/ β -caténine

La voie Wingless (Wnt) joue un rôle crucial dans le contrôle de l'embryogenèse et de l'homéostasie tissulaire chez l'adulte. Des altérations de cette voie de signalisation sont observées dans des pathologies humaines telles que le cancer, l'ostéoporose ou le diabète

de type II (Clevers and Nusse, 2012). On distingue deux voies de transduction induites par les glycoprotéines Wnt, une voie canonique et une voie non-canonique. Dans la voie canonique, les Wnt activent leur cascade de signalisation en se liant au récepteur Frizzled (un RCPG) et au co-récepteur lipoprotein related protein (LRP). Ces interactions induisent la stabilisation et le recrutement d'un co-activateur, la β -caténine. Dans le noyau, la β -caténine s'associe aux T-cell factor (TCF), des facteurs de transcription qui activent les gènes cibles de la β -caténine tels que la cycline D1, c-myc- MMP-7 et MT-MMP. Il semble que dans la voie non-canonique, la transduction du signal induite par la fixation des Wnt n'implique pas les LRP et la β -caténine. Quatorze des 19 ligands Wnt et 8 des 10 récepteurs Frizzled connus sont exprimés dans le placenta humain de 1^{er} trimestre. Les mutations homozygotes des gènes codants pour les Wnt2 et Wnt7b chez la souris induisent des altérations de la taille, de la structure et de la vascularisation placentaire (Parr et al., 2001; Monkley et al., 1996). Il a également été démontré que Wnt3a stimule la prolifération des cellules trophoblastiques en activant le couple β -caténine/TCF et la cycline D1. De plus, une forte expression nucléaire de la β -caténine a été observée dans des CTEV issus de moles hydatiformes. Cette observation suggère que les Wnt sont impliquées dans l'invasion pathologique du placenta (Knöfler and Pollheimer, 2013). Une étude réalisée sur des explants placentaires et des cellules trophoblastiques de la lignée SGHPL-5 a montré que la voie canonique Wnt et la voie PI3K/Akt stimule indépendamment la protéine Wnt3. Cette dernière favorise la sécrétion de MMP-2 par les trophoblastes (Gupta et al., 2016; Meinhardt et al., 2014). Pour conclure, la voie Wnt est activée au cours de la prolifération, de la migration et probablement de l'invasion des cellules trophoblastiques.

e) La voie Focal Adhesion Molecules (FAK)

Les FAK sont des protéines tyrosine kinase (PTK) ubiquitaires situées au sein de complexe d'adhérence (focal adhesion). L'activation de cette voie par des intégrines, des facteurs de croissance et des cytokines induit la phosphorylation du résidu tyrosine en position 397 des FAK. Cette phosphorylation libère un site de liaison pour la protéine Src. La fixation de Src active le complexe d'adhérence qui se compose de FAK, d'actine, de paxilline, de taline et d'autres protéines participant au remaniement du cytosquelette. Les FAK servent d'intermédiaires dans la transmission des signaux entre les protéines du complexe d'adhérence (Cornillon et al., 2003). Des immunomarquages de placentas humains de 1^{er} trimestre ont montré que les FAK et la paxilline sont très exprimées entre la 5^{ème} et la 8^{ème} semaine de grossesse. Cependant, une chute brutale de leur expression est observée à partir de la 10^{ème} semaine de grossesse lorsque la pression en oxygène augmente dans la villosité placentaire. Des études, réalisées *in vitro*, ont montré que l'inhibition des FAK induit une diminution de la prolifération des CTEV et une diminution de l'activité de la MMP-2. Des expériences de co-immunoprécipitation ont montré que les FAK interagissent avec l'intégrine $\alpha\beta3$ dans les CTEV (Kabir-Salmani et al., 2003). De plus, une étude plus récente a montré que les FAK sont nécessaires à l'effet pro-invasif de la cyclosporine sur les CTEV. Enfin, en activant la voie MAPK, les FAK stimulent l'expression des MMP-2/9 et inhibent l'expression de la cadhérine E (Tang et al., 2012).

Les FAK sont capables de phosphoryler des membres de la famille des **Rho**. Les Rho-GTPases sont des petites protéines G qui jouent un rôle important dans l'assemblage de fibres de stress et dans la dynamique du cytosquelette. Les Rho exercent leurs effets *via* les Rho associated kinase (ROCK) qui sont des RCPG ou *via* les p21 activated kinase (PAK).

L'inhibition des Rho induit une diminution de la migration des trophoblastes. L'IGF1 et l'IGF2 favorisent la migration et l'invasion trophoblastique *via* la voie Rho/ROCK (Gupta et al., 2016). En conclusion, les voies FAK et Rho/ROCK favorisent la migration des cellules trophoblastiques.

f) La voie Smad

La voie du **transforming growth factor** (TGF- β) est impliquée dans des processus physiologiques essentiels tels que le développement embryonnaire, la réparation tissulaire, la différenciation et la migration cellulaire. La famille du TGF- β est composée d'une quarantaine de facteurs de croissance qui induisent leurs effets *via* les récepteurs tyrosine kinase de type activin receptor-like kinases (ALK). L'activation de ces récepteurs induit la cascade de signalisation des Smad, qui régulent l'expression de gènes cibles.

Une étude a montré que la protéine Smad2, spécifiquement, est impliquée dans l'effet anti-invasif du TGF- β . En effet, cette voie conduit à l'inhibition de l'expression de la cadhérine VE dans des cellules trophoblastiques de la lignée HTR-8/SVneo (Yang et al., 2009). L'implication de ces différentes voies de signalisation a été résumée dans le Tableau 5 et dans la figure 15.

Tableau 5: Régulateurs de l'invasion et voies de signalisation associées.

		Prolifération	Invasion	Voie de signalisation
EGF	Epidermal growth factor	↗	↗	MAPK, PI3K, JAK-STAT
VEGF	Vascular endothelial growth factor	↗	?	MAPK
IGF2	Insulin like factor 2	↗	↗	MAPK, PI3K, Rho
IGFBP	Insulin-like growth factor-binding protein	↗	↗	FAK, MAPK, PI3K
HGF	Hepatocyte growth factor	↗	↗	MAPK, PI3K
hCG-H	hCG hyperglycosylée	↗	↗	MAPK
Leptine		↗	↗	MAPK, PI3K, JAK-STAT
LIF	Leukaemia inhibitory factor	↗	↗	MAPK, JAK-STAT
IL6	Interleukin 6	↗	↗	JAK-STAT
IL1β	Interleukin 1β	↗		JAK-STAT
Nodal		↘	↘	SMAD
IL10	Interleukin 10	↘	↘	JAK-STAT
TGF-β1	Transforming growth factor β1	↘	↘	SMAD

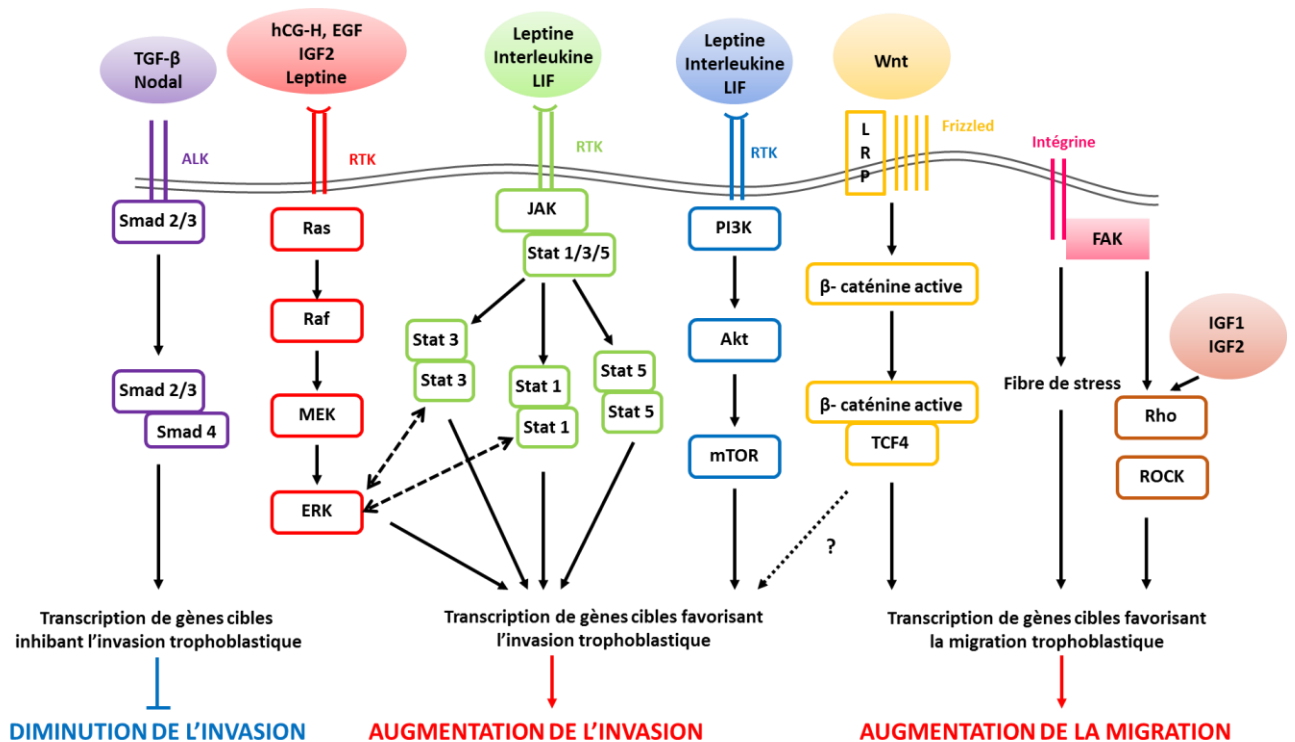


Figure 15: Les principales voies de signalisation impliquées dans la migration et l'invasion trophoblastique.

5) Contrôle de l'invasion trophoblastique par l'endomètre

Dans le paragraphe précédent, nous avons présenté les principaux facteurs régulant l'invasion trophoblastique. Certains sont produits par les cellules trophoblastiques et agissent de manière autocrine. D'autres sont sécrétés par l'endomètre et agissent de manière paracrine. La décidue est composée des cellules déciduales et des cellules immuno-compétentes maternelles qui participent activement au contrôle de l'invasion trophoblastique. Plus précisément, la décidue agit comme une barrière physique et biochimique permettant ainsi de limiter l'invasion trophoblastique au 1^{er} tiers supérieur du myomètre.

De manière surprenante, les co-cultures de cellules trophoblastiques en présence de surnageants de culture de cellules endométriales décidualisées ont abouti à une augmentation de leur pouvoir invasif. L'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans cet effet a montré que la décidue est capable de stimuler la sécrétion des MMP-2, -3 et 9 et l'expression des intégrines $\alpha 5$ et $\alpha 6$ dans les cytotrophoblastes (Sharma et al., 2016b).

Un ensemble de **molécules d'origine endométriale exercent un contrôle négatif sur l'invasion trophoblastique**. Plus précisément, les cellules déciduales et glandulaires sécrètent le TGF- β , le TNF- α , l'IL10, l'IL12 et le G-CSF. Récemment, il a été montré que la surexpression *in vitro* de la décorine, un antagoniste du TGF- β , induit une diminution des capacités prolifératives et invasives des CTEV (Lala and Nandi, 2016). Les cellules immunitaires déciduales telles que les uNK et les macrophages inhibent également l'invasion trophoblastique en sécrétant l'IL-10, le TGF- β , le TNF- α et l'INF γ . Les uNK contrôlent également l'invasion *via* une interaction entre les killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) exprimés à la surface des uNK et les molécules HLA-C exprimées à la surface des CTEV.

En effet, l'association entre les KIR de type AA (KIR-A) et l'HLA-C2 trophoblastique, d'origine paternelle, représente une combinaison néfaste pour l'invasion des CTEV (Moffett and Colucci, 2014).

Parallèlement, les cellules déciduales, glandulaires et immunitaires endométriales sécrètent également des molécules telles que l'EGF, l'IGFBP1, le LIF, l'IL-1 β , l'IL6 et l'IL8 **qui exercent un contrôle positif sur l'invasion trophoblastique**. Les uNK et les macrophages sécrètent des chimiokines et des interleukines pro-invasives telles que l'éotaxine 1 (CCL11), l'interferon gamma-induced protein 10 (CXCL10), l'IL-1 β , l'IL-6 et le LIF (Knöfler and Pollheimer, 2012). Plusieurs travaux ont montré que les MMP sont également exprimées par les cellules stromales endométriales et les uNK. Cette production de MMP endométriale favoriserait la décidualisation des cellules endométriales et par conséquent l'implantation embryonnaire.

Ainsi, nous avons vu que l'invasion trophoblastique est un processus physiologique crucial dans la placentation hémochoriale. Elle nécessite un contrôle spatio-temporel entre trois partenaires, le trophoblaste, l'endomètre et le système immunitaire maternel. Plus précisément, l'endomètre semble favoriser l'invasion trophoblastique dans les étapes précoces de la placentation. Les cellules endométriales exercent ensuite un contrôle négatif sur l'invasion trophoblastique probablement afin d'éviter une invasion trop profonde. Des altérations de cette invasion physiologique entraînent des pathologies de la grossesse associées à des défauts de l'implantation embryonnaire ou de la placentation. Ces pathologies seront décrites de manière détaillée dans le chapitre III.

B- Apoptose trophoblastique

L'apoptose est une mort cellulaire physiologique permettant le maintien de l'homéostasie cellulaire. Cette homéostasie dépend de l'équilibre entre la prolifération et la mort cellulaire. La notion d'apoptose a été introduite pour la première fois en 1972, par Kerr et al, afin de différencier ce suicide cellulaire programmé de la mort cellulaire par nécrose. Le régulateur principal de l'apoptose est la protéine p53.

1) La protéine p53

La **protéine p53**, aussi appelée « gardien du génome », a été découverte en 1979. Elle est composée de 393 acides aminés et a un poids moléculaire de 53kDa. p53 agit comme un facteur de transcription et régule de ce fait l'expression de nombreux gènes cibles. Parmi ses gènes cibles figurent les membres de la famille **mammalian B cell lymphoma-2 (Bcl2)**. p53 est activé par différents stimuli (lésions de l'ADN, hypoxie, stress, agents chimiques, déprivation en nutriments). En condition physiologique, p53 est très peu exprimé. Il peut être présent dans le cytoplasme, dans le noyau ou dans la mitochondrie. Le trafic nucléocytoplasmique de p53 est possible grâce à la présence de séquences de localisation nucléaire (NLS) et d'exportation nucléaire (NES). Au cours du cycle cellulaire, il existe deux points de contrôle durant lesquels l'intégrité de l'ADN est vérifiée. Le premier point de contrôle, qui a lieu pendant la transition G1/S, permet d'éviter la réplication d'ADN endommagé et il est sous le contrôle de p53. Le second point de contrôle a lieu pendant la transition G2/M.

L'expression et l'activité de p53 sont régulées par différentes modifications post-traductionnelles telles que l'ubiquitinylation et la phosphorylation.

L'expression du gène de p53 (TP53) et sa demi-vie sont régulées par une E3 ubiquitine ligase spécifique appelée mouse double minute 2 homologue (**MDM2**). La **poly-ubiquitinylation de p53**, induite par MDM2, entraîne une diminution de la stabilisation de p53 et une augmentation de sa dégradation par le protéasome. Ainsi, en condition normale, la demi-vie de p53 est de vingt minutes. Ceci explique la difficulté à détecter p53 dans certains types cellulaires. De plus, MDM2 réprime l'expression transcriptionnelle de p53. Il est intéressant de noter que le gène codant pour MDM2 est une cible transcriptionnelle de p53. Ceci induit une boucle de rétrocontrôle à travers laquelle p53 peut moduler sa propre expression et son activation. En situation de stress, l'expression de p53 est augmentée. p53 exerce alors un contrôle négatif sur la transcription du gène de MDM2. Cette régulation permet le maintien de l'expression et la stabilisation de p53. Ainsi, la réponse adaptatrice face au stress peut se mettre en place (Biegging et al., 2014).

La protéine p53 est également le substrat de plusieurs kinases. En effet, elle possède plusieurs sites potentiels de phosphorylation (serine et thréonine) situés dans les partie N- ou C-terminale de la protéine. Les dommages génotoxiques, l'hypoxie, les ruptures de l'ADN, les ions oxydants sont capables d'activer de nombreuses kinases. Les phosphorylations de p53 sont généralement des modifications activatrices de la protéine. Elles régulent la stabilisation de p53, son activité et ses interactions avec d'autres protéines. Les phosphorylations de p53 les plus étudiées sont les phosphorylations des résidus Ser15 et Ser20. Suite à un stress génotoxique, le résidu Ser15 est phosphorylé essentiellement par les kinases ATM (ataxia telangiectasia mutated) ou ATR (ataxia telangiectasia and Rad3-related protein). De plus, il a été montré, qu'en réponse à une déplétion en nutriment, la Ser15 de p53 est phosphorylée par la voie de l'AMP-activated protein kinase (AMPK). La

phosphorylation de p53 sur le résidu Ser15 modifie la conformation spatiale de la protéine et bloque son interaction avec MDM2. Ceci aboutit à une augmentation de la demi-vie de p53 et à une stabilisation de la protéine (Ashcroft et al., 1999). Une étude récente, par spectrométrie de masse, a permis de mettre en évidence une cinquantaine de sites potentiels de modifications post-traductionnelles de p53. p53 est capable d'être ubiquitinylée, phosphorylée, acétylée, méthylée, glycosylée, sumoylée, ribosylée, et néddylée. L'importance de p53 dans la régulation de l'homéostasie cellulaire a été mise en évidence à l'aide de modèles de souris transgéniques qui développent des tumeurs spontanées (Donehower et al., 1992). Le même constat a été observé chez des patients atteints du syndrome de Li-Fraumeni, suite à des mutations de TP53 dans la lignée germinale (Kamihara et al., 2014). En fonction du stimulus, p53 peut induire i) l'arrêt de la prolifération cellulaire, ii) la réparation de l'ADN ou iii) l'apoptose de la cellule (Figure 16).

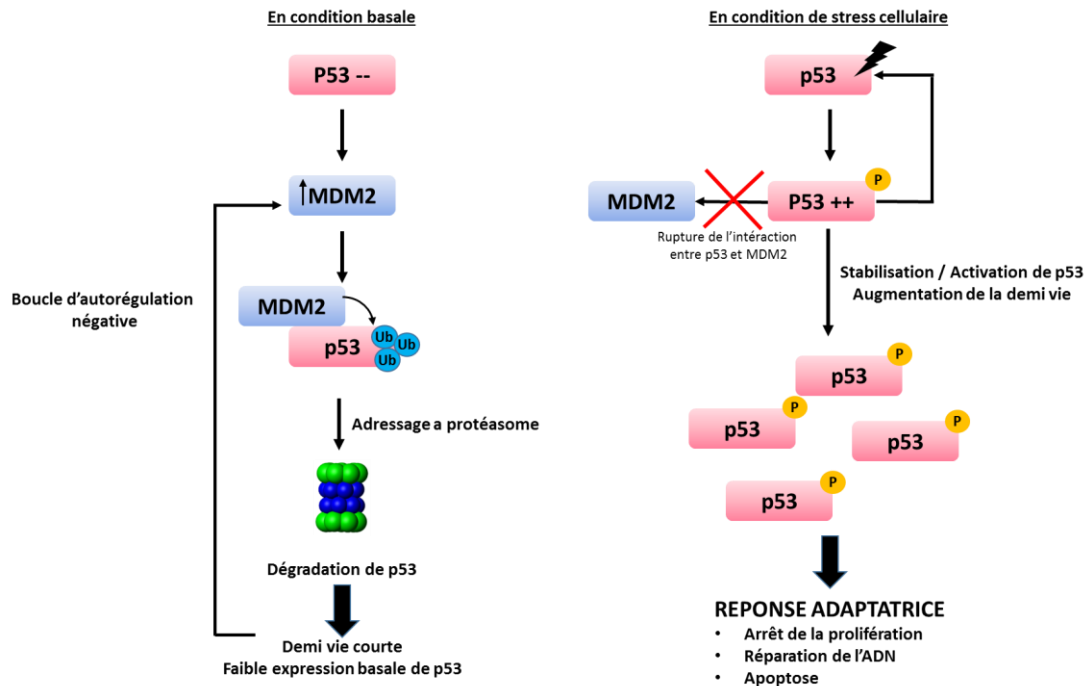


Figure 16: Régulation de l'expression et de l'activité de p53.

En absence de stress, la protéine p53 active l'expression de son inhibiteur MDM2. L'interaction entre p53 et MDM2 favorise l'adressage et la dégradation de p53 par le protéasome. En présence d'un stress génotoxique ou cellulaire, l'expression de p53 augmente rapidement. Des modifications post-traductionnelles activatrices induisent la dissociation entre p53 et MDM2 et favorisent sa transactivation.

2) La famille B cell lymphoma-2 : Bcl2

Les protéines Bcl2 sont les **gardiens de l'intégrité de la membrane mitochondriale externe**.

La famille du Bcl2 se compose d'environ 20 membres qui sont regroupés en trois sous-groupes fonctionnels. Les membres de cette famille sont caractérisés par la présence de un à quatre domaines fonctionnels appelés Bcl2 Homology (BH). Ces domaines participent à la reconnaissance des membres de la famille du Bcl2 et régulent leur homo- ou hétéro-dimérisation. La présence d'un domaine transmembranaire (TM) permet l'ancrage de certaines protéines de la famille de Bcl2 dans la membrane mitochondriale ou dans la membrane du réticulum endoplasmique. En fonction de leur structure, certains membres de cette famille sont pro-apoptotiques et d'autres sont anti-apoptotiques (Figure 17).

- **Les membres anti-apoptotiques** : Bcl2, Bcl-XL, Mcl1 possèdent de deux à quatre des domaines fonctionnels (BH-1, BH-2, BH-3 et BH-4).
- **Les membres pro-apoptotiques** : Bax, Bak, Mtd/Bok, Bcl-XS, n'expriment jamais le domaine BH-4.
- **Les membres pro-apoptotiques « BH3-only »**: Noxa, PUMA, Bik, Hrk, Bim, Blk, Bid, expriment uniquement le BH-3. Ils favorisent l'activité des Bcl2 pro-apoptotiques ou inhibent l'activité des Bcl2 anti-apoptotiques.

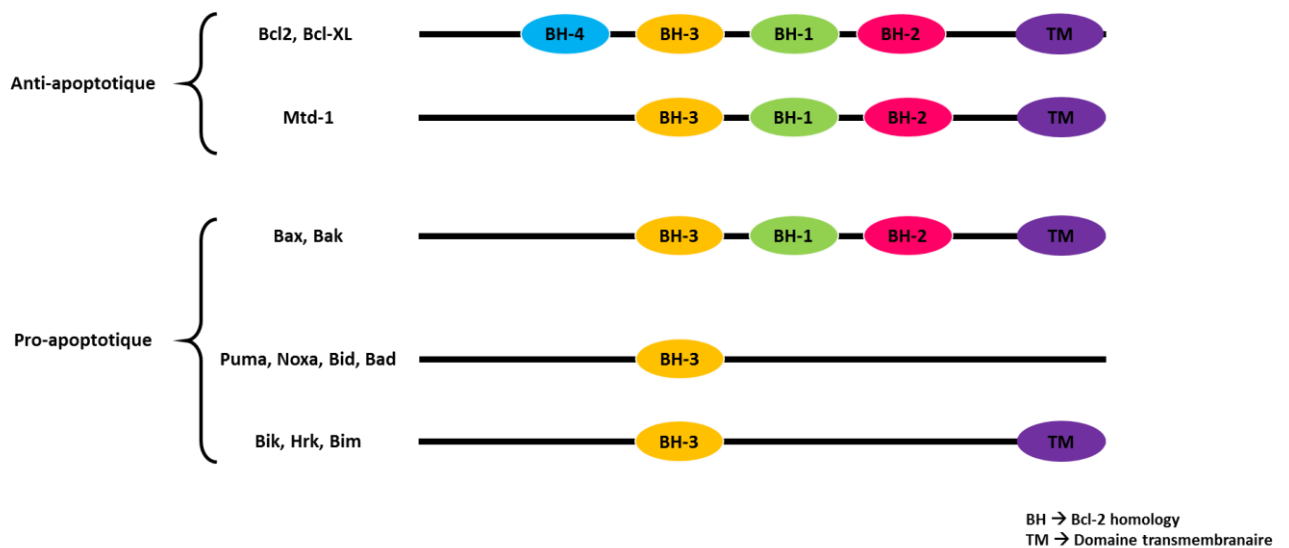


Figure 17: Structure des membres de la famille Bcl2.

Les membres de la famille de Bcl2 possèdent de un à quatre domaines fonctionnels Bcl2 Homology (BH). On distingue trois sous familles : les membres anti-apoptotiques de type Bcl2/Mtd-1, les membres pro-apoptotiques de type Bax/Bak et les membres pro-apoptotiques de type « BH3 only ».

3) Les caspases

Les **caspases** sont les effecteurs centraux de l'apoptose. Les caspases appartiennent à la famille des protéases à cystéine. Elles peuvent être divisées en deux sous-familles. Les **caspases initiatrices** (2, 8, 9 et 10) et les **caspases effectrices** (3, 6 et 7). Les caspases initiatrices activent par clivages les caspases effectrices. L'activation de cette cascade des caspases permet d'amplifier et de prolonger le signal apoptotique. Les caspases peuvent

être réprimées par des **inhibitors of apoptosis proteins (IAP)**, des membres anti-apoptotiques de la famille du Bcl2 ou des **FLICE-like inhibitory proteins (FLIP)**. L'activation des caspases effectrices est le point de non-retour de l'apoptose.

4) L'apoptose

L'**apoptose** se caractérise par des modifications morphologiques et biochimiques des cellules qui permettent de la différencier de la mort par nécrose. L'apoptose peut être induite par deux voies distinctes. **La voie intrinsèque dite mitochondriale** dépendante de p53 ou la **voie extrinsèque** qui fait intervenir la fixation de ligands aux récepteurs à domaine de mort. Ces deux voies convergent vers une activation des caspases effectrices et aboutissent à la mort cellulaire par apoptose. Nous présenterons ici les mécanismes de l'apoptose *via* la voie mitochondriale uniquement.

L'apoptose par la **voie mitochondriale est induite par un stress cellulaire** et fait intervenir la **succession de quatre étapes :**

- La « reconnaissance » d'un dommage cellulaire suite à différents stimuli.
- La régulation transcriptionnelle des gènes impliqués dans la cascade de l'apoptose (p53, membres de la famille Bcl2).
- L'altération de la perméabilité de la membrane mitochondriale.
- La modification de l'activité des caspases.

Suite à l'activation de l'apoptose, l'expression de p53 augmente rapidement. p53 régule de nombreux gènes cibles dont les membres de la famille Bcl2 qui sont essentiels à la régulation de l'apoptose. Les membres de la famille Bcl2 interagissent les uns avec les autres et

regulent leurs activités respectives. Pour cela, ils forment des homo-hétérodimères. En fonction du dimère formé, une réponse pro- ou anti-apoptotique sera induite. Par exemple, les interactions Bax/Bax et Bax/Bak favorisent une réponse pro-apoptotique dans la mitochondrie. L'équilibre entre l'expression des membres pro- ou anti-apoptotiques de la famille Bcl2 oriente donc la réponse apoptotique (Chipuk et al., 2010). La surexpression des membres pro-apoptotiques conduit à une diminution du potentiel de la membrane mitochondriale et à une perméabilisation de la membrane externe mitochondriale. Ceci aboutit à la libération, dans le cytosol, de protéines normalement présentes uniquement dans l'espace inter-membranaire de la mitochondrie. Parmi les protéines mitochondriales libérées se trouve le **cytochrome c**. Une fois dans le cytosol, le cytochrome c se lie à la protéine adaptatrice **apoptotic protease activating factor-1 (APAF-1)** et à la **caspase 9, initiateur**. Le complexe formé par ces trois partenaires, appelé l'**apoptosome**, active alors la cascade des caspases. Les caspases 3, 6 et 7 activées clivent une grande variété de protéines intracellulaires telles que des endonucléases, des protéases et des protéines du cytosquelette. L'apoptose précoce se manifeste par une désorganisation de la membrane plasmique qui aboutit à l'**exposition de résidus phosphatidylsérine (PS)** sur la face externe de la membrane. Cette perturbation est liée à la dérégulation, par les caspases, d'enzymes telles que l'aminophospholipide translocase et le phospholipide scramblase. Ces deux enzymes sont impliquées dans la répartition asymétrique des phospholipides membranaires. De plus, il a été montré que la désorganisation de la membrane plasmique est associée à la rupture, dépendante des caspases, de l'interaction entre les PS et une protéine du cytosquelette, la fodrine. Au final, cette désorganisation membranaire conduit à l'expression de marqueurs pro-phagocytaires. De manière plus tardive, l'apoptose se caractérise par la

condensation du noyau et la fragmentation de l'ADN par des endopeptidases. Des enzymes telles que l'endonucléase G (Endo G) ou la nucléase DNA Fragmentation Factor 40 (Dff40) sont également activées par les caspases. L'apoptose aboutit à la division de la cellule en corps apoptotiques qui sont éliminés par les cellules adjacentes ou par phagocytose (Figure 18) (Elmore, 2007).

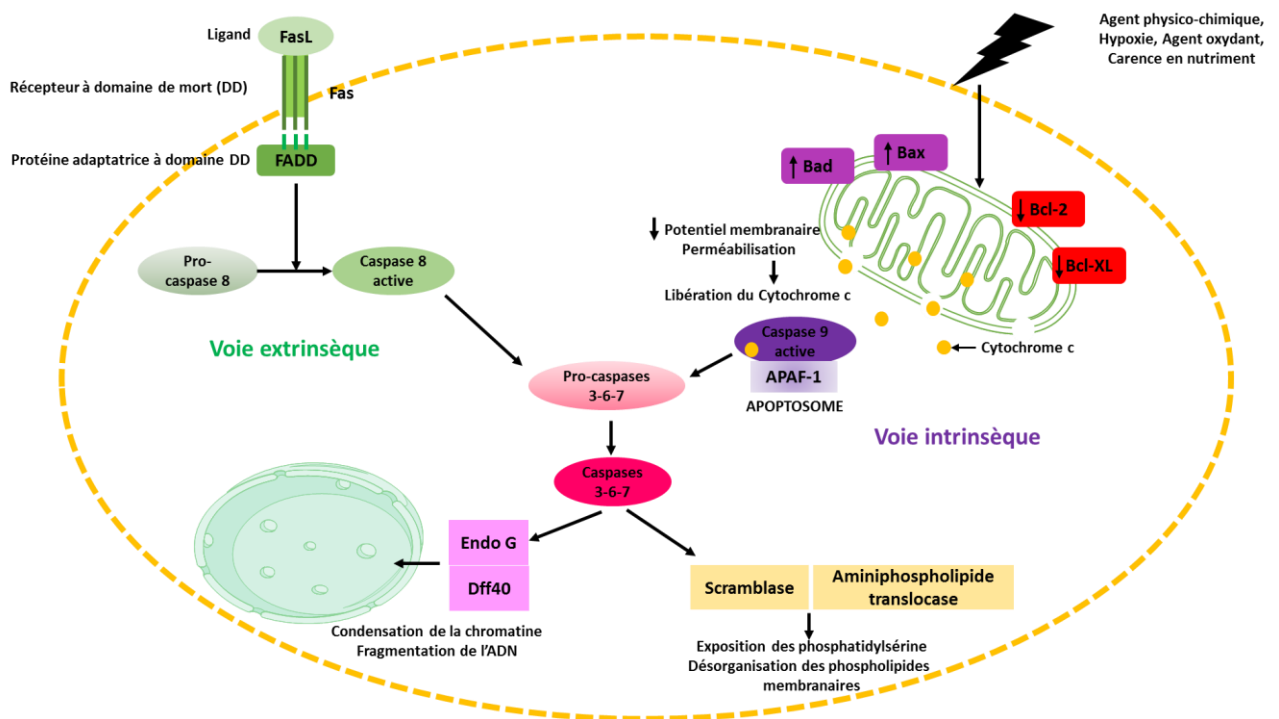


Figure 18: Les voies principales de l'apoptose.

En fonction du stimulus, l'apoptose peut être initiée selon deux voies. Dans la voie extrinsèque, l'apoptose est induite par la fixation d'un ligand à un récepteur à domaine de mort (DD) de la famille du Tumor Necrosis Factor. Cette interaction induit le recrutement de protéines adaptatrices à domaine de mort qui activent la caspase initiatrice 8. Dans la voie intrinsèque, l'apoptose est induite par différents stimuli qui activent p53. p53 favorise l'expression des membres pro-apoptotiques de la famille du Bcl2 qui induisent une diminution du potentiel de la membrane mitochondriale. Ceci aboutit à la formation de mégapores et à la libération, entre autres, du cytochrome c dans le cytoplasme. Le cytochrome c s'associe à la caspase 9 et à la protéine APAF-1 pour former l'apoptosome. La caspase 8 et l'apoptosome activent la cascade des caspases effectrices qui est responsable des manifestations de l'apoptose. FADD: Fas associated death domain, Endo G: endonucléase G, Dff40: DNA Fragmentation Factor 40, APAF-1: apoptotic protease activating factor-1.

5) Apoptose des cytotrophoblastes

Le placenta, comme tous les organes, est soumis à une apoptose physiologique qui participe à l'homéostasie cellulaire. Le renouvellement du tissu placentaire est plus particulièrement dépendant de **l'apoptose des CTV** (Mayhew, 2001). Le syncytiotrophoblaste (ST), qui est issu de la fusion des CTV, n'est pas capable de proliférer. Son développement dépend donc de la croissance, de la fusion et de l'apoptose des CTV. Après avoir rempli leurs fonctions, les noyaux du ST se regroupent dans des protrusions membranaires appelées « knots » syncytiaux. Ces corps apoptotiques se décrochent des villosités choriales et sont libérés dans la circulation maternelle. La cascade apoptotique est initiée dans le CTV et se termine dans le ST. En effet, les CTV expriment les pro-caspases effectrices 3, 6 et 7. En revanche, le ST exprime les caspases 3 et 6 actives. D'autre part, il semble qu'il existe un arrêt du programme apoptotique dans le ST directement après la fusion des CTV. Cet arrêt est probablement dû à la présence de facteurs anti-apoptotiques de la famille du Bcl2 dans les CTV. De plus, des inhibiteurs endogènes des caspases 8 et 10 tels que les FLIP et les IAP participent également au blocage du processus apoptotique (Straszewski-Chavez et al., 2005). Quelques semaines plus tard, la cascade apoptotique est réactivée dans le ST par des mécanismes encore inconnus.

Plusieurs études ont montré que les facteurs normalement impliqués dans la cascade apoptotique interviennent également dans la différenciation du ST. Dans le placenta humain, cette **apoptose différenciante** est principalement régulée par la caspase initiateur 8. En effet, l'externalisation des PS et le clivage de la fodrine, qui sont dépendants de la caspase 8, sont des pré-requis à la fusion des CTV en ST. L'inhibition, *in vitro*, de la caspase 8 à l'aide d'un inhibiteur spécifique ou par des ARN interférents supprime la fusion des CTV

humains et aboutit à l'accumulation de CTV (Black et al., 2004). La caspase 14 est également impliquée dans la régulation de la différenciation trophoblastique. Elle régule négativement la fusion trophoblastique en inhibant l'acétylation et par conséquent l'activité du facteur de transcription pro-différenciant **glial cell missing factor**, GCM1 (Wu et al., 2013). Ainsi, il a été montré dans le placenta humain que **l'apoptose peut être un régulateur positif de la différenciation trophoblastique.**

Les mécanismes régulant **l'apoptose des CTEV** restent très mal connus. Il a été montré que les CTEV expriment Fas et FasL. De plus les CTEV prolifératifs expriment spécifiquement les facteurs anti-apoptotiques Bcl2 et Mcl-1. L'expression de Bcl2 disparaît à la faveur de l'expression de la caspase 3 lorsque les CTEV acquièrent un phénotype invasif. Ceci aboutit à une augmentation des taux d'apoptose des CTEV invasifs par comparaison aux CTEV prolifératifs. Les auteurs suggèrent que cet apoptose des CTEV invasifs représente probablement un mécanisme permettant de limiter l'invasion trophoblastique (Murakoshi et al., 2003; Huppertz et al., 2006).

6) Apoptose endométriale

L'apoptose joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie cellulaire au cours du cycle menstruel. Cette apoptose est observée plus particulièrement dans l'épithélium glandulaire et à la fin du cycle menstruel. Elle met en jeu les membres de la famille du Bcl2 et le système FasL/Fas (Harada et al., 2004). La couche fonctionnelle de l'endomètre est le lieu d'une croissance, d'une différenciation et d'une apoptose cycliques physiologiques. Des études ont montré que Bax, la caspase 3 et le Fas sont exprimés majoritairement dans cette couche fonctionnelle. En revanche, Bcl2 est exprimé de manière cyclique et majoritairement dans la couche basale de l'endomètre, qui varie très peu au cours du cycle menstruel. L'expression

de Bcl2 est maximale pendant la phase proliférative de l'endomètre. D'autres travaux ont mis en évidence que les hormones stéroïdes participent également à la régulation de l'apoptose endométriale. En effet, les œstrogènes semblent favoriser l'expression de Bcl2. Cette régulation positive explique la forte expression de Bcl2 durant la phase proliférative. Inversement, la progestérone inhibe l'expression de Bcl2. Cet effet négatif sur l'expression de Bcl2 conduit à un effet pro-apoptotique à la fin du cycle menstruel (Reis et al., 2013). FasL et Fas sont exprimés dans l'endomètre humain tout au long du cycle menstruel. Néanmoins, au cours de la phase proliférative, ces protéines sont retenues dans l'appareil de Golgi et dans des vésicules intra-cytoplasmiques. Au cours de la phase sécrétoire, FasL et Fas sont libérés et peuvent alors exercer leur effet pro-apoptotique (Harada et al., 2004).

L'apoptose endométriale est une étape clé de l'implantation embryonnaire. En effet l'invasion du trophoblaste dans l'endomètre maternel est dépendante d'une apoptose très contrôlée des cellules épithéliales endométriales (EEC). Des études, menées *in vitro*, indiquent que le trophoblaste sécrète des molécules anti-apoptotiques qui favorisent la survie des EEC. Ainsi, l'embryon peut adhérer et s'ancrer à l'endomètre. Après cette phase d'adhésion, le trophoblaste exerce un effet pro-apoptotique sur les EEC *via* l'interaction entre les FasL exprimés à la surface de l'embryon et les Fas présents sur les EEC. Ces interactions spécifiques favorisent l'enfouissement de l'embryon dans l'utérus maternel (Boeddeker and Hess, 2015). Les trophoblastes participent également à **l'instauration de la tolérance immunitaire**. En effet, les trophoblastes semblent contrôler l'apoptose endométriale des cellules B et T activées. Par ce mécanisme, les cellules trophoblastiques, qui expriment des antigènes paternels, se protègent du système immunitaire maternel. Il a été démontré que l'HLA-G5 induit un effet pro-apoptotique sur les cellules T activées. Elle

est responsable de la quasi disparition des lymphocytes activés à l'interface fœto-maternelle. Les trophoblastes exercent cet effet pro-apoptotique *via* l'interaction entre FasL (présents à leur surface) et Fas (exprimés par les lymphocytes activés) (Mesdag et al., 2014). Enfin, les CTEV induisent **l'apoptose des cellules endothéliales au cours du remodelage des artères utérines spiralées**. En effet, il est bien connu que le remodelage des artères utérines est dépendant d'une invasion orientée des CTEV endovasculaires. Il a été montré, par immunohistochimie, que dans un premier temps, les CTEV endovasculaires coexistent transitoirement avec les cellules endothéliales des vaisseaux utérins. Ensuite, les CTEV endovasculaires remplacent totalement les cellules endothéliales. Les mécanismes impliqués dans le remodelage artériel placentaire restent très peu connus. Néanmoins, des modèles de co-cultures ont mis en évidence un effet apoptotique des CTEV sur les cellules endothéliales. Ce mécanisme semble encore une fois mettre en jeu le couple FasL/Fas (Ashton et al., 2005).

7) Apoptose et grossesses pathologiques

De nombreuses études ont mis en évidence une augmentation de l'apoptose dans des placentas issus de grossesses pathologiques telles que la pré-éclampsie ou le retard de croissance intra-utérin. Cette apoptose concerne principalement le ST. Une augmentation de la quantité de débris syncytiaux a été observée dans le sérum maternel de femmes présentant une pré-éclampsie. Il semble que la présence de ces débris syncytiaux soit en partie responsable des altérations endothéliales observées dans les cas de pré-éclampsie. En effet, les knots en excès induisent une réponse inflammatoire systémique et la libération d'espèces réactives à l'oxygène. L'origine de l'augmentation de cette apoptose n'est pas clairement définie (Sharp et al., 2010). Néanmoins il a été montré que dans les explants placentaires issus de grossesses pathologiques (RCIU et PE), le pourcentage d'apoptose est

plus élevé que dans des explants issus de grossesses normales après l'exposition à des agents tels que le TNF α ou l'exposition à l'hypoxie. Ces résultats suggèrent que les cellules trophoblastiques des placentas pathologiques présentent une susceptibilité accrue à l'apoptose, peut-être médiée par l'altération de régulateurs intracellulaires. Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués ne sont pas encore déterminés. (Heazell and Crocker, 2008; Heazell et al., 2011).

Chapitre III. Les pathologies de la grossesse

Les fausses couches spontanées, la pré-éclampsie, le retard de croissance intra-utérin et la prématurité sont des pathologies majeures de la grossesse dont les mécanismes sous-jacents restent méconnus. Elles semblent être associées à des défauts du dialogue fœto-maternel, de l'immunos tolérance et à des altérations de la fonction placentaire. Ces pathologies peuvent avoir une origine maternelle et/ou placentaire et/ou fœtale.

A- Les fausses couches à répétition

1) Définition

La définition des fausses couches à répétition (FCR) est très variable selon les auteurs. En 2014, la définition des FCR a été revue par le collège national des gynécologues et obstétriciens français. On parle à présent de FCR après « **la répétition de trois fausses couches consécutives avant 14 semaines d'aménorrhées (SA) au sein du couple** » (Gallot et al., 2014). On différencie les fausses couches (FC) précoces, avant 14 SA, des FC tardives entre 14 et 22 SA. Au-delà de 22 SA, on parle de mort fœtale *in utero*. Les FCR sont fréquentes et concernent 15 à 20 % des grossesses. Elles sont idiopathiques dans 50% des cas. On observe une augmentation du risque de récurrence avec le nombre d'accidents antérieurs : 7-35 % après deux FC, 25-46 % après trois FC et supérieur à 50 % après six FC (Ogasawara et al., 2000).

2) Etiologies des FCR

En dehors de la mise en évidence d'une anomalie génétique létale pour l'embryon, la cause d'une FCR ne peut être affirmée. Néanmoins, un certain nombre de facteurs de risques ont été identifiés (Figure 19).

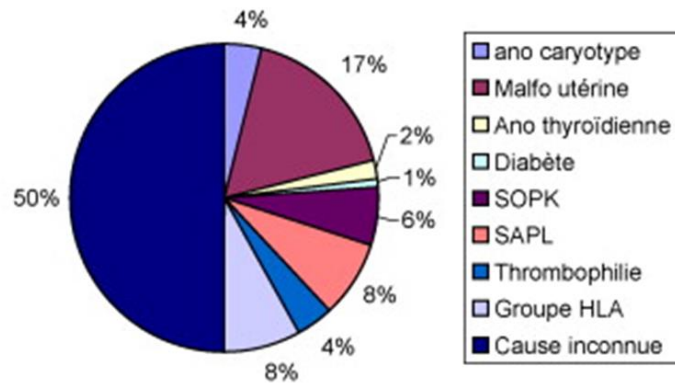


Figure 19: Etiologies des fausses couches à répétition.

D'après Lejeune V, 2010. Les fausses couches à répétition peuvent être induites par des facteurs génétiques, anatomiques; endocriniens ou immunitaires. SOPK : Syndrome des ovaires polykystiques ; SAPL : syndrome des anti-phospholipides ; HLA : Human leucocyte antigen ; ano : anomalie et malfo : malformation.

a) Les causes chromosomiques embryonnaires

On estime que 50 à 60 % des FC sporadiques sont dues à des anomalies chromosomiques de l'embryon. Dans 94 % des cas, il s'agit **d'anomalies du nombre de chromosomes ou aneuploïdie** telles que les trisomies (16, 18, 21, 22), la triploïdie et la monosomie du chromosome X. Dans 6 % des cas, il s'agit **d'anomalies de structure**, dont la moitié serait héritée de translocations équilibrées présentes chez l'un des parents (Boué and Boué, 1976). Il semblerait que les FC associées à des anomalies chromosomiques de l'embryon soient dues à un phénomène naturel de sélection des embryons inaptés au développement. Il existe une forte corrélation entre la fréquence des aneuploïdies et l'âge maternel (Gallot et al., 2014). Par conséquent, dans le cadre du bilan de FCR, les anomalies génétiques

parentales doivent être plus particulièrement explorées. L'anomalie la plus fréquemment retrouvée chez des couples qui sont sujets à des FCR est une **translocation réciproque** (échange de matériaux entre deux chromosomes) dont la fréquence est de 2 à 3 %, soit plus de 20 fois supérieure à celle de la population générale. Enfin, une augmentation de 2 à 3 fois du nombre de **translocations de type robertsonienne** (induites par la fusion de deux chromosomes par leurs centromères) a été observée dans les FCR par comparaison avec la population générale (Fryns and Van Buggenhout, 1998).

b) Les causes utérines

Des anomalies anatomiques de l'utérus sont associées à une plus forte prévalence des FCR. Ces malformations utérines peuvent être congénitales (cloison utérine, hypertrophie, bicorne) ou acquises (synéchies, fibrome, béance cervicale). Plusieurs travaux ont montré une augmentation de la fréquence d'utérus cloisonné chez des femmes présentant des FCR (entre 20-30 % contre 0,1 % dans la population générale).

Une étude, publiée en 2016, a associé la survenue de FCR à un déficit en cellules souches endométriales. Cette altération de la plasticité endométriale induit des défauts de la décidualisation qui aboutit à un mauvais dialogue entre l'endomètre et l'embryon (Lucas et al., 2016).

c) Les causes endocriniennes

L'impact des sécrétions hormonales dans la survenue de FCR reste mal connu. Néanmoins, il est bien établi que les pathologies thyroïdiennes et le diabète non équilibré sont des facteurs de risques pour les FCR. L'implication du syndrome des ovaires polykystiques, de

l'hyper-prolactinémie et des insuffisances lutéales dans la survenue de FCR est controversée (Gallot et al., 2014; Lejeune, 2010; Christiansen et al., 2005).

d) Les causes immunitaires

Des défauts de la tolérance immunitaire ont été associés aux FCR. La population de cellules immunitaires à l'interface fœto-maternelle a donc été étudiée afin de mieux comprendre l'impact de l'immunologie dans le processus de FCR. Il a clairement été établi qu'il existe une diminution du nombre d'uNK dans l'utérus de femmes présentant des FCR. Il semblerait que cette diminution est induite par une inhibition de l'expression d'ostéopontine dans la décidue maternelle. L'ostéopontine est une glycoprotéine qui agit comme une chimiokine en favorisant le recrutement des cellules uNK dans la décidue (Qu et al., 2008).

Toutes les **maladies inflammatoires auto-immunes** (maladie de Crohn, lupus...) sont également des facteurs de risques de FCR. Le syndrome des anti-phospholipides (SAPL) a clairement été identifié comme une cause de FCR. Au cours de cette maladie auto-immune, l'organisme synthétise des auto-anticorps dirigés contre les phospholipides favorisant ainsi la formation de thromboses veineuses et/ou artérielles. Chez les femmes enceintes atteintes de SAPL, les anticorps anti-phospholipides provoquent des fausses couches spontanées en induisant une inflammation et une obstruction des vaisseaux placentaires altérant ainsi la fonction placentaire (Lejeune, 2010).

L'identification de biomarqueurs des pathologies de la grossesse est un véritable enjeu clinique. Un biomarqueur est idéalement de type protéique accessible dans les liquides corporels (sérum, plasma, urine maternelle) et facilement dosable à l'aide de tests immunologiques. Il doit être sensible, spécifique, très reproductible et accessible

financièrement (Barboux et al., 2015). Néanmoins l'accessibilité à des techniques telles que la spectrométrie de masse, les puces d'expression ou le séquençage de nouvelle génération (NGS) permet d'envisager des biomarqueurs issus de l'étude de sécrétomes ou des acides nucléiques (ADN, ARN, micro-ARN).

Différents travaux ont tenté d'identifier des biomarqueurs de la fausse couche spontanée. Des études datant des années 1990 ont évalué le potentiel de l'hCG, de l'early pregnancy factor (EPF) et du facteur d'activation placentaire (PAF). Malgré des premiers résultats prometteurs, la capacité de ces molécules à servir de biomarqueur des FC a été invalidée par des études postérieures (Recurrent Pregnancy Loss Causes, Controversies, and Treatment, Howard Carp, 2014). Du fait des origines variées des FCR, il n'existe à ce jour aucun biomarqueur. Actuellement, la conduite à tenir en clinique consiste à mener une enquête approfondie afin de déterminer l'étiologie de la FC. Diagnostiquer l'origine génétique, immunitaire ou hormonale des FCR permet alors d'agir en conséquence et de proposer un traitement adapté.

B- La pré-éclampsie

1) Définition

La pré-éclampsie (PE), aussi appelé toxémie gravidique, est un syndrome multifactoriel spécifique de l'espèce humaine dont les premiers symptômes se manifestent au cours du second trimestre de la grossesse. Cette pathologie placentaire touche 3 à 7 % des grossesses dans le monde (World Health Organization International Collaborative Study of Hypertensive Disorders of Pregnancy, 1988). Les complications de la PE entraînent la mort d'environ

50 000 femmes par an. Dans les pays en voie de développement, où l'accès aux soins est limité pour les femmes enceintes, les taux de mortalité maternelle sont de 15%. Ils sont inférieurs à 2% dans les pays industrialisés (Ghulmiyyah and Sibai, 2012). Il est difficile de définir ce syndrome dont la physiopathologie reste très mal connue. Il y a 50 ans, la PE était définie par « l'apparition d'une hypertension et d'une protéinurie au cours du second trimestre de la grossesse » (Nelson, 1955). La PE est aujourd'hui caractérisée par « **une hypertension artérielle gravidique *de novo* (> 140/90 mmHg) accompagnée d'une protéinurie (> 300 mg/24h) apparues au-delà de 20 semaines d'aménorrhée**. Il n'existe pas « une » mais « des » PE qui sont définies en fonction de la gravité du tableau clinique associé. La complication extrême de la PE est la survenue de l'éclampsie. L'éclampsie vient du grec « **eclampsis** » qui signifie lumière éclatante ou jet de lumière en référence à la soudaineté des crises convulsives chez les patientes.

2) Etiologies et facteurs de risques de la PE

Les causes exactes de la PE restent inconnues. Cette difficulté à déterminer l'étiologie de la PE vient du fait qu'il ne s'agit pas d'une maladie bien définie mais d'un syndrome complexe aux causes multiples et dont les manifestations cliniques diffèrent entre les patientes. Néanmoins, un certain nombre de facteurs de risques de la PE ont été décrits. Notamment, il a été observé une plus forte prévalence de la PE chez les femmes nullipares (qui n'ont jamais eu d'enfant) ou chez des femmes multipares avec primipaternité (première grossesse pour un couple donné). Ces données permettent de définir **une origine paternelle**, probablement liée à un conflit immunitaire, dans la survenue de la PE. Des **facteurs d'origine maternelle** liés à l'**âge** (adolescente ou > à 40 ans), à l'**ethnie** (population d'origine africaine), aux **antécédents de PE**, à l'**obésité**, au **diabète**, à l'**hypertension chronique** ou à des **syndromes**

métaboliques sont aussi associés à un risque majoré de PE. Le tabagisme avant ou pendant la grossesse semble diminuer le risque de PE (Merviel et al., 2008; Duckitt and Harrington, 2005).

De nombreuses études ont été menées afin de déterminer s'il existe une origine génétique de la PE. Une première étude, menée par Chesley et collaborateur, tentait de mettre en évidence l'implication de facteurs familiaux dans l'étiologie des maladies hypertensives de la grossesse. Cette étude fait référence à un cas d'éclampsie décrit en 1873 au cours duquel une femme est décédée durant sa cinquième grossesse. Les cinq filles de cette femme ont également subi des éclampsies au cours de leurs grossesses et trois d'entre elles sont décédées (Chesley, 1980).

En 2004, une étude a montré, dans une grande cohorte scandinave, que la PE présente une base génétique avec une héritabilité d'environ 50 %. Il semble que la PE peut être associée à l'altération de gènes maternels et fœtaux (Cnattingius et al., 2004).

La disparité entre les populations étudiées, les méthodologies employées dans ces études ainsi que la physiopathologie de la PE compliquent la recherche de facteurs génétiques. Il est difficile de définir clairement si les gènes qui ressortent de ces études sont à l'origine de la PE ou seulement des facteurs aggravant la pathologie. Par conséquent, il n'existe actuellement aucun gène candidat de la PE accepté universellement.

Néanmoins, des associations entre des polymorphismes et le syndrome de la PE ont pu être mis en évidence. Une liste non-exhaustive des facteurs de risques génétiques de la PE ont été décrits dans le tableau 6. Le gène STOX1 fait partie des premiers gènes de susceptibilité à la PE décrits dans la littérature. L'analyse de huit familles de sœurs pré-éclampsiques

hollandaises, nées de grossesses associées à de la PE ou à de l'hypertension gestationnelle, a permis de mettre en évidence une héritabilité d'origine maternelle de la mutation Y153H du gène STOX1 (van Dijk et al., 2005). STOX1 est un facteur de transcription dont les gènes cibles directs ne sont actuellement pas clairement définis. L'implication de STOX1 dans la PE a été controversée dans différentes études (Iglesias-Platas et al., 2007; Kivinen et al., 2007). Néanmoins, plusieurs études *in vitro* (cellules trophoblastiques JEG-3 ou SGHPL-5 sur-exprimant STOX1) et *in vivo* (souris sur-exprimant STOX1) laissent à penser qu'il s'agit d'un gène essentiel dans la physiopathologie de la PE (Ducat et al., 2016; Doridot et al., 2014, 2013; Rigourd et al., 2008; van Dijk et al., 2005).

Tableau 6: Facteurs de risques génétiques d'origine maternelle impliqués dans la PE.

Fonction	Gène	Nom complet	Locus	Type de mutation
Protéines vasoactives	AGT	Angiotensinogen	1q42.2	Polymorphisme M235T
	ACE	Angiotensinogen converting enzyme	17q23.3	Insertion/ Délétion dans l'intron 16
Fonction endothéliale	VEGF	Vascular endothelial growth factor	6p21.3	Polymorphisme 936C/T
Immunomodulation	FAS	apoptosis antigen 1 (APO-1)	10q24.1	Polymorphisme A670G
	IL-10	Interleukin 10	1q32.1	Polymorphisme G1082A
Fonction placentaire	LEPR	Leptin receptor	1p31	Polymorphisme rs 1137100
	STOX1	Storkhead box 1	10q22	Polymorphisme Y153H
Thrombophilie	SERPINE1	Plasminogen activator factor-1	14q32.13	Insertion/ Délétion dans le promoteur

Des travaux récents ont mis en évidence des associations entre des micro-ARN et la survenue de PE. De manière similaire à l'étude des polymorphismes et des gènes candidats de la PE, ces études n'ont pas permis de mettre clairement en évidence des mi-ARN candidats de la PE.

Néanmoins, plusieurs études ont montré une surexpression du **miR-210** dans des placentas et dans des sérums maternels issus de PE (Anton et al., 2013; Liu et al., 2012; Pineles et al., 2007). Les taux circulants de miR-210 semblent être corrélés avec la gravité de la PE (Zhang et al., 2012). L'expression sérique du miR-210 et de plusieurs autres micro-ARN codés par le C19MC étant altérée dans la pré-éclampsie, ceux-ci sont actuellement considérés comme de potentiels biomarqueurs de la pré-éclampsie (Luque et al., 2014).

3) Symptômes de la PE

Le syndrome pré-éclampsique peut se manifester de multiples façons et il est associé à divers symptômes qui apparaissent tardivement au cours de la grossesse. Ces symptômes et complications sont décrits dans le tableau 7.

L'ensemble de ces symptômes ne sont pas retrouvés systématiquement (Sibai et al., 2005). L'hétérogénéité dans les manifestations cliniques de la pré-éclampsie complique le diagnostic de cette pathologie et a abouti à l'établissement de sous catégories de pré-éclampsie. On distingue les **PE sévères** qui apparaissent précocement (<34 SA) et qui sont associées à de hauts risques de morbidité et de mortalité maternelle et fœtale, des **PE modérées** (hypertension artérielle gravidique > 140 et < 159 mmHg). Les PE sont qualifiées de sévères lorsque l'un des critères suivant est diagnostiqué : une hypertension artérielle gravidique sévère (> 160/110 mmHg), des troubles neurologiques, des douleurs épigastriques, une oligurie (<500 ml/ 24h), une insuffisance rénale progressive, une thrombopénie, un œdème pulmonaire, un syndrome HELLP (Haemolysis-Elevated Liver enzymes-Low Platelets count), une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) ou un retard de croissance intra-utérin (American College of Obstetricians and Gynecologists and Task Force on Hypertension in Pregnancy, 2013).

L'unique traitement durable contre la PE consiste à extraire l'unité foeto-placentaire. Une augmentation du taux de prématurité peut donc être imputée à l'apparition d'un syndrome de pré-éclampsie.

Tableau 7: Symptômes et complications associés à la pré-éclampsie.

D'après Sibai 2005. La PE est associée à des complications maternelles et fœtales. Ces complications touchent des organes divers et variés et ne sont pas retrouvées systématiquement en cas de PE.

Origine de la complication	Atteinte au niveau	Symptôme	Fréquence	
MATERNELLE		Hypertension		
		Protéinurie		
	Cérébral		Céphalées	
			Troubles visuels	
			Troubles auditifs	
			Accident Vasculaire Cérébral	rare
			Eclampsie	< 1 %
	Gastrique		Douleurs épigastriques	
			Nausées, Vomissements	
	Hémostase		Thrombopénie (baisse du taux de plaquettes)	
			Hémolyse aiguë (destruction des globules rouges)	
			Coagulation intravasculaire disséminée (CIVD)	
	Rénal		Insuffisance rénale aiguë	1-5 %
	Pulmonaire		Œdème pulmonaire	2-5 %
	Hépatique		HELLP syndrome	10-20 %
		Œdèmes		
Placentaire		Hématome Retro placentaire	1-4 %	
		Mort maternelle	rare	
FOETALE		Retard de croissance intra-utérin	10-25 %	
		Prématurité	15-67 %	
		Lésions neurologiques liées à l'hypoxie	< 1 %	
		Mort périnatale	1-2 %	

4) Physiopathologie de la PE

Il est aujourd'hui admis que le placenta joue un rôle central dans l'apparition de la PE. De manière simpliste, la genèse de la PE est imputée à un **défaut de la placentation**, qui aboutit à une **hypoxie placentaire** (phase 1, asymptomatique) dans les premières semaines de la

grossesse. Cette étape induit un **stress oxydatif placentaire** qui est à l'origine de **dysfonctionnements endothéliaux maternels** (phase 2, symptomatique) qui provoquent les symptômes observés chez la mère dans la deuxième partie de la grossesse (Figure 20).

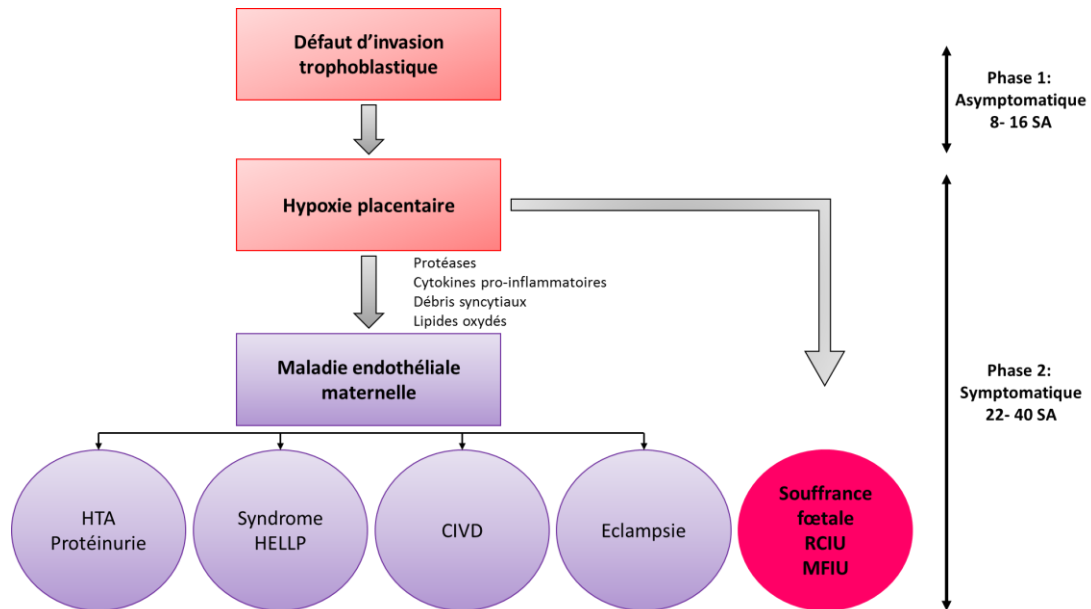


Figure 20: Schéma classique de la physiopathologie de la pré-éclampsie.

CIVD : coagulation intravasculaire disséminée, HTA : hypertension artérielle, MFIU : mort fœtale *in utero*, RCIU : retard de croissance intra-utérin, SF : souffrance fœtale.

a) Dysfonctionnement placentaire

Le remodelage vasculaire normal du placenta implique la disparition de la tunique musculaire lisse artérielle et le remplacement des cellules endothéliales maternelles par les CTEV. Il permet ainsi aux artères utérines de perdre leur contractilité et de ne plus répondre aux facteurs vasoconstricteurs. Cette étape permet de réguler le flux sanguin arrivant dans la chambre intervillieuse tout au long de la grossesse. De plus, les cellules trophoblastiques produisent des **facteurs angiogéniques** tels que le VEGF, le PIGF et des **facteurs vasoactifs** tels que le monoxyde d'azote qui sont responsables du remodelage profond des artères utérines spiralées. Un dialogue entre les CTEV, les cellules déciduales et les cellules

immunitaires (en particulier les uNK) présents à l'interface fœto-maternelle, est nécessaire au bon déroulement du remodelage vasculaire (Figure 21).

De manière générale, la PE est associée à un remodelage incomplet des artères utérines spiralées. En effet, une analyse histologique de placentas de femmes présentant une PE sévère par comparaison avec des femmes contrôles a montré une diminution significative de l'invasion trophoblastique dans les artères spiralées (-56 %) et dans les artères myométriales (-24 %) (Meekins et al., 1994). Ceci suggère un lien direct entre **l'altération du remodelage vasculaire et l'invasion trophoblastique lors de PE**. De plus, de multiples travaux ont mis en évidence des altérations des mécanismes moléculaires qui contrôlent l'invasion trophoblastique au cours de PE. Parmi eux, des altérations de **l'expression des protéines de surface** telles que les intégrines ou les cadhérines ont été observées dans des placentas issus de grossesses avec une PE (Zhou et al., 1997). Une diminution de l'expression de **protéases placentaires et plasmatiques** telles que les **métalloprotéases 9**, la **PAPPA** ou **l'urokinase-type plasminogen activator (uPA)** a également été observée lors de PE. D'autre part, une augmentation de l'expression d'inhibiteurs du plasminogène tels que **PAI-1** (Graham and McCrae, 1996) ou d'inhibiteurs de protéases tels que les **SERPINE** (Chelbi et al., 2007) a été montré dans des cas de PE.

Les altérations de l'invasion trophoblastique peuvent être **d'origine immunitaire**. En effet, il a été montré que les macrophages, qui sont très présents dans la paroi artérielle lors de PE, inhibent l'invasion trophoblastique de manière paracrine. Ces cellules macrophagiques induisent **l'apoptose des cellules trophoblastiques** *via* la sécrétion de tumour necrosis factor alpha (TNF- α) et de monoxyde d'azote (DiFederico et al., 1999). De plus, l'équipe de Philippe Le Bouteiller a mis en évidence une diminution de l'expression de HLA-G dans les

cellules trophoblastiques dans les cas de PE (Le Bouteiller et al., 2003). Enfin, chez la mère l'expression des récepteurs NK killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) de type AA associée à l'expression homozygote des molécules HLA-C2 chez le fœtus, augmentent le risque de PE (Parham, 2004). En effet, cette interaction induit la sécrétion de cytokines par les uNK qui altèrent l'invasion trophoblastique (Moffett and Colucci, 2014).

Le défaut de l'invasion trophoblastique entraîne une augmentation de la résistance vasculaire et une altération de la perfusion utéroplacentaire. Ces anomalies entraînent une réduction de l'apport nutritionnel à l'interface fœto-maternelle et un état d'**hypoxie placentaire chronique** (Pijnenborg et al., 2006).

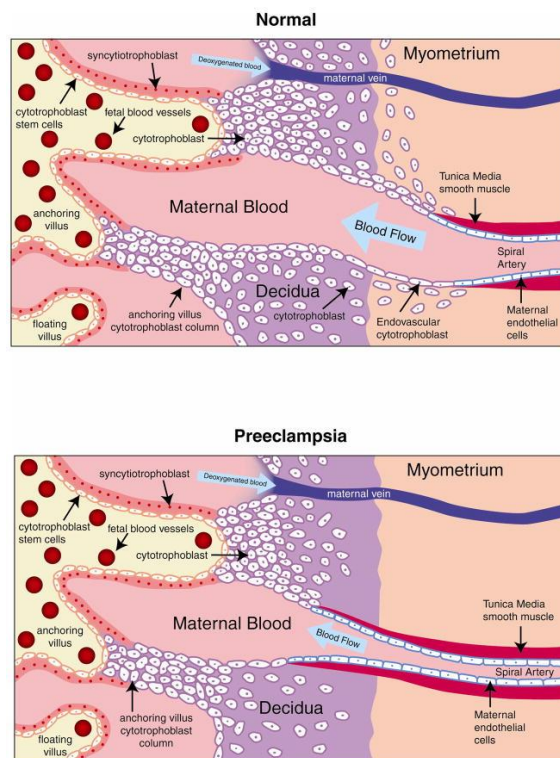


Figure 21: Altération du remodelage des artères utérines au cours de la PE.

D'après Lam et al, 2005. Le panneau du haut décrit un endomètre en seconde partie de grossesse normale lorsque les artères spiralées ont été remodelées jusqu'à la partie supérieure du myomètre. Les artères présentent un plus large calibre, sont atones et ne sont pas sensibles aux agents vasoconstricteurs. Le panneau du bas décrit un endomètre lors de la PE. On constate un remodelage artériel altéré, moins étendu et un calibre réduit des artères utérines.

b) Dysfonctionnement endothélial maternel

Il a été montré que l'hypoxie placentaire chronique induit un stress oxydatif placentaire. Ce stress oxydatif joue un **rôle central dans la symptomatologie de la pré-éclampsie** car il est à l'origine des **dysfonctionnements endothéliaux maternels**.

Sous l'effet du stress oxydatif, on note une augmentation significative du relargage d'**espèces réactives à l'oxygène (ROS)**, de **métabolites de la peroxydation lipidique** ou de **résidus nitrotyrosines** lors de la pré-éclampsie (Staff et al., 1999). Ces métabolites toxiques, induisent un déséquilibre redox intracellulaire qui participe à l'altération de l'endothélium maternel.

Ce déséquilibre du statut redox, observé lors de PE, induit également une altération de la maturation protéique. Ceci provoque une accumulation de protéines mal repliées (unfolded proteins) dans la lumière du réticulum endoplasmique et aboutit *in fine* à un **stress du réticulum endoplasmique**. (Kalkunte et al., 2013).

Enfin, il a été montré que la pré-éclampsie est associée à une augmentation significative de l'apoptose et de la nécrose du ST, qui induit une augmentation de la libération de débris syncytiaux dans la circulation maternelle (Rajakumar et al., 2012; Tannetta et al., 2013). Ces débris participent à l'altération de la fonction endothéliale maternelle en induisant une réponse pro-inflammatoire et anti-angiogénique délétère.

L'ensemble de ces facteurs libérés dans la circulation maternelle favorise l'apparition de la maladie endothéliale maternelle.

Le dysfonctionnement endothélial au cours de la pré-éclampsie se manifeste par une augmentation de la sécrétion de **marqueurs de l'activation et de lésions endothéliales** tels

que le facteur de Von Willebrand, l'endothéline, la fibronectine, la thrombomoduline et le vascular-endothelial cell-adhesion molecule (V-CAM) (Chavarría et al., 2002; Nadar et al., 2004). Ces facteurs d'origine endothéliale participent à l'apparition de coagulopathies observées lors de la pré-éclampsie.

Par ailleurs, la dysfonction placentaire génère des facteurs qui sont libérés dans la circulation maternelle et qui sont impliqués dans les lésions endothéliales maternelles. Certains de ces facteurs sont décrits dans le tableau 8.

Tableau 8: Facteurs d'origines placentaires impliqués dans les lésions endothéliales maternelles.

D'après Tsatsaris et al, 2010. Le dysfonctionnement placentaire observé lors de la PE est responsable du relargage dans la circulation maternelle de substances qui participent à l'altération de l'endothélium maternel.

Facteurs de croissance	Hormones	Cytokines	Enzymes	Autres
↘ EGF	↘ hCG	↗ TNF- α	↗ PAI-1	↗ Lipides oxydés
↘ VEGF	↘ hCG-H	↗ IL-1 α	↘ PAI-2	↗ Phospholipides
↘ PlGF	↘ Leptine	↗ IL-6	↗ MMP-2	↗ ROS
↗ sFlt-1		↘ IL-10	↘ MMP-9	↗ Endothélines
↗ Endogline soluble		↗ INF	↘ PAPP-A	↗ Fragments syncytiaux circulants
		↘ LIF	↗ Renalase	↗ Protéines mal repliées

Parmi ces facteurs, nous nous focaliserons sur le VEGF, le PlGF et l'Endogline soluble qui ont permis d'établir un lien concret entre les anomalies placentaires et le dysfonctionnement endothélial. Le **VEGF** et le **PlGF** sont des facteurs de croissance qui régulent l'angiogenèse. Ils sont nécessaires à la prolifération des cellules endothéliales. Le soluble fms-like tyrosine kinase-1 **sFlt-1** est un récepteur soluble qui lie le VEGF et le PlGF. Au cours d'une grossesse normale, le placenta produit des concentrations modérées de VEGF, PlGF et sFlt-1. En revanche, lors de la PE, la sécrétion de sFlt-1 dans la circulation maternelle est augmentée. Cette augmentation sFlt-1 a été associée à l'apparition des symptômes de la PE (Maynard et

al., 2003). Il en résulte une diminution drastique des taux circulants de VEGF et de PlGF. La diminution de ces deux facteurs de croissance conduit i) à l'altération des fonctions endothéliales et ii) à l'apparition dans certains cas de PE à des néphropathies glomérulaires. Cette observation laisse à penser que l'équilibre sFlt1/PlGF est essentiel à l'établissement d'une grossesse non pathologique.

L'**endogline soluble (sEng)** est un récepteur soluble du TGF- β 1 et du TGF- β 3. Elle joue un rôle dans l'homéostasie vasculaire. Comme le sFlt-1, sa sécrétion est augmentée au cours de la PE. Il semble que l'augmentation des taux d'endogline soluble aggrave les lésions endothéliales déjà présentes, augmente la perméabilité vasculaire et favorise l'apparition du HELLP syndrome (Lecarpentier et al., 2016).

Il est intéressant de noter que le schéma proposé précédemment (Figure 20) ne permet pas d'expliquer tous les cas de PE rencontrés notamment les cas de PE non associées à des altérations de la placentation. Dans 70 % des cas, les PE ne sont pas associées à un retard de croissance intra-utérin (RCIU). Or, si un dysfonctionnement placentaire était forcément à l'origine de PE, le taux de RCIU devrait être plus élevé. De plus, la majorité des symptômes liés à la PE tels que le HELLP syndrome (20 %) et l'éclampsie (55 %) ne se déclarent qu'après la 37^{ème} semaine de grossesse. Ceci suggère qu'il existe plusieurs origines à la PE. L'**origine strictement placentaire** de la PE pourrait expliquer les PE sévères. Une dysfonction endothéliale pré-existante chez la mère, qui sera exacerbée par la grossesse, pourrait conduire à une PE d'**origine strictement maternelle de la PE**. Enfin, il existe des PE aux **origines maternelles et placentaires** qui combinent les deux dysfonctionnements (Staff et al., 2013). Ces différentes origines de la PE sont résumées dans le modèle intégré présent dans la figure 22.

Les travaux visant à déterminer des **biomarqueurs de la pré-éclampsie** ont mis en évidence que le **PIGF**, le **sFlt-1** et le **sEng** sont de bons candidats. De multiples travaux ont démontré une diminution significative des taux de PIGF au cours de RCIU associés ou non à de la PE et au cours de PE modérées ou sévères. Une altération de la sécrétion de PIGF a aussi été mise en évidence dans des cas de PE et PE sévères (Chappell et al., 2013). Une étude publiée très récemment a de nouveau confirmé l'intérêt clinique du dosage du PIGF. Cette étude prospective, multicentrique, de 47 biomarqueurs potentiels a montré que les différences de sécrétion du PIGF entre les grossesses normales ou pathologiques sont plus marquées en début de grossesse. Le PIGF semble être un bon biomarqueur du dépistage précoce de la PE. Cette étude a montré des résultats similaires pour les facteurs sFlt-1 et sEng (Duckworth et al., 2016). Une seconde étude très récente a montré l'intérêt d'étudier le ratio sFlt-1/PIGF comme un biomarqueur des PE. Cette étude visait dans un premier temps à déterminer une valeur seuil du ratio sFlt-1/PIGF à prendre en compte (n= 500) et dans un second temps à valider ce seuil avec une seconde cohorte (n= 550). Ce travail a permis i) de montrer une augmentation du ratio sFlt-1/PIGF chez des femmes présentant une PE, ii) de définir un seuil sFlt-1/PIGF de 38 et iii) de prédire 37 % de PE de 1 à 4 semaines avant l'apparition des signes cliniques en utilisant ce ratio. Dans cette étude, les auteurs concluent que la mesure du ratio sFlt-1/PIGF permet de mieux prédire les PE que la mesure isolée des facteurs PIGF et sFlt-1 (Zeisler et al., 2016).

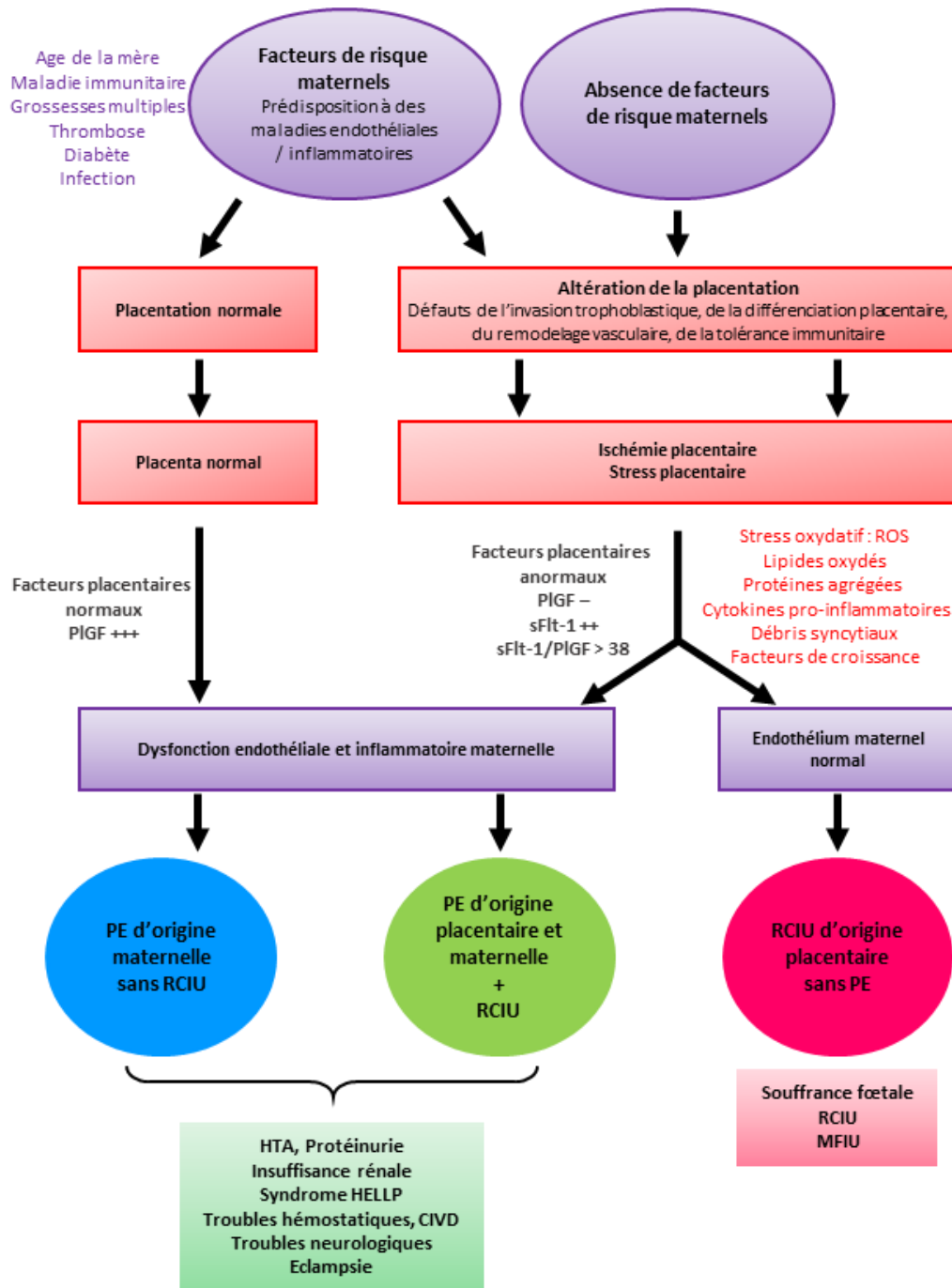


Figure 22: Modèle intégré de la physiopathologie de la PE.

C- Le retard de croissance intra-utérin (RCIU)

1) Définition

Un fœtus est qualifié de **petit pour son âge gestationnel (PAG)** lorsque son poids est inférieur à un seuil donné, classiquement le **10^{ème} percentile**. On parle de **PAG sévère** lorsque le poids du fœtus est inférieur au **3^{ème} percentile**. Ces seuils sont définis à partir de **courbes de poids de références** établies à partir de données épidémiologiques pour une population donnée. En France, les courbes de croissance de références datent de 1979 et semblent ne plus être adaptées à la population actuelle (Scherdel et al., 2015). Par conséquent, de nouvelles courbes morphométriques ajustées et remises à jour pour la population française ont été développées et sont de plus en plus utilisées (Figure 23).

Le **retard de croissance intra-utérin (RCIU)** s'applique à un fœtus avec un PAG pour lequel un **défaut de croissance** dynamique semble être établi. Le diagnostic étiologique du RCIU repose sur plusieurs mesures biométriques qui évaluent le diamètre bipariétal (diamètre entre les deux os pariétaux crâniens), les périmètres crânien et abdominal et la longueur des os longs (fémur, humérus). Ceci permet une estimation du poids fœtal. On parle de cassure de la courbe de croissance lorsque les mesures échographiques (au moins deux mesures dans un intervalle de trois semaines) mettent en évidence i) un **infléchissement de la courbe de croissance** d'un fœtus par rapport à la courbe de croissance standard associée, et/ou ii) un **arrêt de la croissance** (Ego, 2013).

On distingue deux types de RCIU :

- **Les RCIU harmonieux (symétriques)**, qui sont **précoces**, rapidement sévères et qui concernent 30 % des RCIU. Ils affectent tous les paramètres et sont fréquemment

associés à une anomalie génétique du fœtus ou à une embryo-fœtopathie liée à un agent infectieux ou iatrogène (toxique...).

- Les **RCIU disharmonieux (asymétriques)**, qui surviennent **plus tardivement** et qui concernent 70 % des RCIU. Ils n'altèrent pas toutes les mesures et sont souvent issus d'une insuffisance utéroplacentaire. Les fœtus présentent un développement normal jusqu'au 3^{ème} trimestre de grossesse (Sharma et al., 2016a).

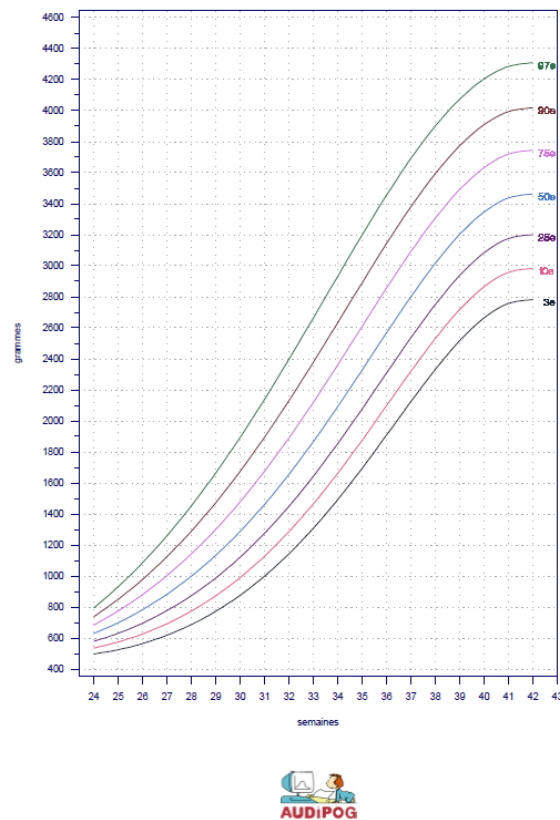


Figure 23: Exemple de courbe morphométrique néonatale remise à jour pour la population française (filles).

Courbe issue de données intégrées à partir de 200 000 naissances entre 1999 et 2015 en France. Source www.audipog.net.

2) Etiologie des RCIU

Les RCIU peuvent être d'origine maternelle, placentaire ou fœtale. Néanmoins 40% des RCIU sont idiopathiques.

a) Les causes maternelles

Les causes maternelles associées aux RCIU sont multiples et variées. Elles concernent 40% des cas de RCIU. L'apparition de RCIU a été associée à des facteurs de prédisposition tels que **l'âge de la mère** (< 20 ans ou > 35 ans), son **poids**, sa **taille**, son **ethnie**, son **niveau socio-économique** et **l'altitude de son lieu d'habitation**. Un autre facteur de risque maternel associé aux RCIU provient de l'existence de **pathologies chroniques** qui affectent la perfusion placentaire. Parmi ces pathologies, on note l'hypertension artérielle, le diabète, des vasculopathies, des néphropathies, l'hypoxie chronique, un lupus ou des malformations utérines. **L'environnement maternel** participe également à la survenue de RCIU. L'intoxication par des médicaments, de la drogue, de l'alcool ou une malnutrition chronique augmente le risque de RCIU (Hendrix and Berghella, 2008). Les **antécédents de grossesses** influencent également la physiopathologie du RCIU. En effet, on note une augmentation de la prévalence de RCIU chez des femmes présentant des antécédents de RCIU ou dont la grossesse a fait appel à des procédés d'AMP. Enfin, **l'infection par des pathogènes** tels que les **agents TORCH** qui sont responsables de la Tuberculoses, **Other** (agents de la varicelle ou chlamydia), de la Rubéole, de l'infection au Cytomégalovirus, à l'Herpès, l'agent responsable du paludisme, des infections urinaires ou des vaginoses bactériennes sont capables d'induire des RCIU (Sharma et al., 2016a). Dans les pays développés, les infections par la toxoplasma gondii ou le cytomegalovirus sont associées à un risque accru de RCIU. En Afrique et en Asie du Sud-Est, l'agent pathogène du paludisme est le plus impliqué dans les RCIU. L'agent du

paludisme est capable d'activer des processus immunitaires et inflammatoires qui affectent le système vasculaire. Il induit plus particulièrement l'obstruction des vaisseaux qui diminuent ainsi l'apport de nutriments au fœtus (Rogerson et al., 2004).

L'ensemble de ces facteurs de risques d'origine maternelle sont susceptibles d'altérer l'apport en substrat nutritif au fœtus et d'induire par ce biais un RCIU.

b) Les causes placentaires

Une étude menée par Heinonen et collaborateur, a montré une corrélation **entre le poids placentaire** et le poids de naissance du fœtus. Cette étude comparative de placentas, issus de grossesses normales (n= 15074) ou associés à des RCIU (n= 1569), indique une diminution de la taille du placenta (-24 %) et du poids du placenta lors de RCIU. Cette étude établit un lien entre le RCIU et la surface d'échange diminuée dans des placentas de petite taille (Heinonen et al., 2001). Des **ischémies**, une **hypovascularisation**, des hémangiomes placentaires (une tumeur vasculaire bénigne) ou des **anomalies d'implantation** du placenta (placenta praevia, inséré trop bas dans l'utérus) ont été décrits dans des cas de RCIU. D'une manière générale, le RCIU est associé à des **altérations de la surface villositaire** qui est diminuée par un excès d'apoptose. Ces altérations réduisent les échanges de gaz, de nutriments et la libération d'hormones placentaires nécessaires au bon développement du fœtus (Heazell et al., 2011). De plus, les résultats de doppler d'artères utérines et des vaisseaux ombilicaux indiquent une **augmentation de la résistance artérielle**. Des défauts de l'angiogenèse et des lésions vasculaires lors de RCIU sont les conséquences d'un défaut de l'invasion trophoblastique en début de grossesse. L'ensemble de ces observations confirme la thèse d'une origine placentaire des RCIU induite par l'incapacité du placenta à répondre aux besoins nutritionnels du fœtus (Sharma et al., 2016a).

c) Les causes fœtales

Le fœtus est la source du RCIU dans 15 % des cas. Ce type de RCIU est généralement associé à des anomalies chromosomiques (7 à 20 %) ou à des syndromes malformatifs. Les **anomalies génétiques** les plus retrouvées dans des cas de RCIU sont les **trisomies** des chromosomes 13 (syndrome de Patau), 18 (syndrome d'Edwards) et 21 (syndrome de Down) et de manière moindre des **disomies uniparentales** (deux chromosomes d'une même paire proviennent du même parent). Un grand nombre de syndromes génétiques poly-malformatifs sont associés à un RCIU. Parmi ces syndromes, nous pouvons citer les syndromes de Bloom, de Silver-Russell, de Cornelia de Lange, ou le nanisme Mulibrey (Sharma et al., 2016a; Gross, 1997). Des malformations congénitales sans défaut génétique identifié sont la source de 1 à 2 % des RCIU. Enfin, le RCIU peut être induit par les **grossesses multiples** (3 % des cas de RCIU). En particulier, le syndrome transfuseur-transfusé lors de grossesses gémellaires mono-choriales (un seul placenta pour les deux fœtus).

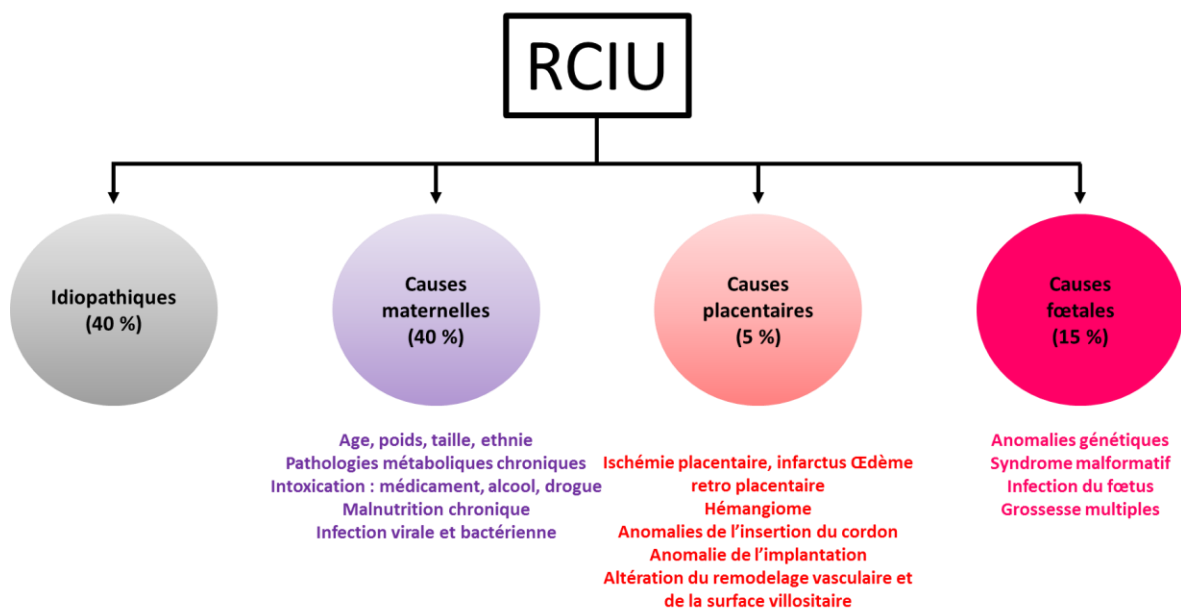


Figure 24: Facteurs de risques du retard de croissance intra-utérin.

D'après Sharma et al, 2016.

Chapitre IV. Le Facteur PréImplantatoire (PIF)

A- Découverte et caractérisation du PIF

1) Contexte de recherche

L'origine du Facteur PréImplantatoire (PIF) remonte au début des années 1990 et provient de travaux issus de l'Immunologie de la Reproduction. Depuis les travaux de Sir Peter Medawar en 1953, il est clairement établi que la mise en place et le maintien d'une grossesse font intervenir des mécanismes immunitaires complexes aboutissant à l'apparition d'une tolérance à l'interface foëto-maternelle. Ce dialogue entre l'organisme maternel et l'embryon débute précocement au cours de la gestation et aboutit à l'acceptation de l'embryon. Des modifications de l'immunité maternelle sont observées à partir de la fécondation de l'ovocyte (O'Neill, 2005; Teles et al., 2013). De plus, différents arguments laissent à penser que l'embryon joue un rôle actif dans l'adaptation du système immunitaire maternel à la grossesse. En effet, des embryons semi-allogéniques, voire totalement allogéniques dans le cadre du don d'embryons ou d'ovocytes, peuvent s'implanter dans l'endomètre maternel. L'embryon a la faculté de s'implanter de manière ectopique dans d'autres tissus lors de grossesses dites extra-utérines. De plus, il est bien établi que seuls les embryons viables peuvent s'implanter. Enfin, le transfert de plusieurs embryons est associé à de meilleurs taux de succès en F.I.V. Face à ces observations, plusieurs équipes se sont

mises à la recherche de facteurs d'origine embryonnaire aux propriétés immunomodulatrices détectables dans la circulation sanguine maternelle.

2) Découverte et caractérisation du PIF

Ce facteur a été identifié pour la première fois en 1994 dans le sérum de femmes enceintes à l'aide d'un test immunologique adapté du test d'inhibition de rosette (RIT) alors utilisé par les immunologistes.

1. Le test d'inhibition de rosette

Apparu au début des années 1970, ce test diagnostique a d'abord été décrit comme étant capable de prédire les risques de rejet après une transplantation d'organe (Bach et al., 1969). Il consiste à mettre en contact des lymphocytes ou monocytes d'un patient greffé en présence d'érythrocytes de mouton et de quantifier le taux d'agrégation des érythrocytes autour d'un lymphocyte (rosette) en présence de différentes doses d'immunosuppresseurs. Avec cette approche, les immunologistes ajustaient alors les doses d'immunosuppresseurs tout au long des traitements (Bewick et al., 1972; Munro et al., 1971). En 1977, Morton et collaborateurs publient dans la revue Lancet une étude dans laquelle ils détournent le RIT afin de mettre en évidence un facteur immuno-modulateur embryonnaire présent dans le sérum de femmes enceintes, l'early pregnancy factor ou EPF (Morton et al., 1977, 1976).

2. Découverte du PIF

Le PIF a été mis en évidence en 1994 par l'équipe du Dr Barnea à l'aide d'une variante du RIT qu'ils baptisèrent le lymphocyte platelet binding assay (LPBA). Toujours dans le but d'identifier des molécules embryonnaires capables de réguler l'immunité maternelle, les auteurs ont mis en contact des lymphocytes et des plaquettes issus d'un donneur mâle O⁺ en

présence de sérum de femmes enceintes (4 jours après une F.I.V) ou de sérums contrôles issus de femmes non enceintes. Après 10 min d'incubation, le taux de formation de rosettes était évalué par comptage au microscope optique. Une rosette est caractérisée par l'association d'un lymphocyte fixé par trois plaquettes au minimum. Le test d'agrégation était considéré comme positif à partir d'un pourcentage de rosettes supérieur à 8 %. A l'aide de cette approche, les auteurs ont montré une augmentation significative du nombre de rosettes formées en présence de sérum maternel par comparaison aux contrôles (Barnea et al., 1994; Coulam et al., 1995; Roussev et al., 1995). Ces premiers résultats semblant indiquer la présence d'un facteur sécrété dans le sérum maternel, les auteurs tentèrent de l'identifier. Ils effectuèrent leurs tests en ajoutant cette fois de l'hCG, de la Pg, de l'E2, du platelet activating factor (PAF) ou de l'EPF, alors considérés comme des facteurs embryonnaires. Aucune différence significative n'a été observée après l'ajout de ces molécules. Les auteurs conclurent qu'il s'agissait d'un nouveau facteur embryonnaire qu'ils baptisèrent Preimplantation Factor (PIF). Ils validèrent le LPBA comme un test spécifique permettant de mesurer l'activité du PIF.

3. Purification et caractérisation du PIF

Deux ans après la mise en évidence de ce nouveau facteur embryonnaire, la source de production ainsi que la structure du PIF n'étaient toujours pas déterminées. En utilisant le LPBA en présence de milieux de culture d'embryons (stade 2 à 8 cellules) humains issus de F.I.V, à la place des sérums maternels, les auteurs ont pu mettre en évidence une activité du PIF dans les surnageants de culture d'embryons (3 embryons/ puits) dès le stade 2 cellules. En revanche, les milieux de culture sans embryon (contrôle) ou en présence d'embryons non viables ou en présence d'un unique embryon viable, ne montrent pas d'activité du PIF.

L'ensemble de ces observations suggérant une sécrétion embryonnaire du PIF par des embryons viables uniquement et probablement à des taux très faibles, les auteurs décidèrent d'utiliser des embryons murins afin de déterminer le seuil de détection du PIF par le LPBA. De nouveau, l'activité du PIF a pu être détectée uniquement avec des surnageants de culture en présence de plusieurs embryons. De plus, une augmentation de la formation du nombre de rosettes a été associée au stade de développement embryonnaire avec un maximum d'activité au stade de blastocyste. L'activité du PIF a donc été détectée dans des surnageants de cultures embryonnaires humains et murins. Les auteurs conclurent que ce facteur possède une origine embryonnaire et qu'il est sécrété dans les stades précoces de développement uniquement par les embryons viables et aptes à s'implanter (Roussev et al., 1996).

Le PIF a été isolé et purifié en 1996 à partir de surnageants embryonnaires murins par chromatographie liquide à haute performance puis caractérisé partiellement par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Cependant, la structure protéique complète du PIF n'a été publiée qu'en 2004. On sait à présent qu'il s'agit d'un peptide dont la forme majoritaire est de 15 acides aminés ([H]-MVRKPGSANKPSDD-[OH]). Il existe différents isoformes du PIF qui partagent tous une région commune de 9 acides aminés ([H]-MVRKPGSA-[OH]). Par modélisation informatique, il a été montré que le PIF est un nouveau peptide dont la séquence protéique partage une homologie avec une seule protéine connue et issue du parasite responsable de la malaria, *Plasmodium falciparum* (Figure 25).

Si la séquence peptidique du PIF a été identifiée, l'origine génomique de ce facteur reste à déterminer. En effet, la traduction *in silico* des 15 acides aminés du PIF en diverses séquences nucléotidiques potentielles n'aboutit à ce jour à aucun gène connu chez les

mammifères. Néanmoins, lorsque la recherche se focalise sur la région hautement conservée ([H]-MVR IKPGSA-[OH]) des différentes versions du PIF, on constate que le gène codant pour cette portion de peptide est localisé uniquement sur le locus q24.3 du chromosome 14 chez l'Homme. L'analyse des données expérimentales, issues d'expérimentations de RNA-seq sur une cellule embryonnaire unique (stade 8 cellules), a montré que cette région située sur le chromosome 14 code pour un transcrit récemment identifié et dont l'expression est spécifique de l'embryon (Xue et al., 2013; Yan et al., 2013).

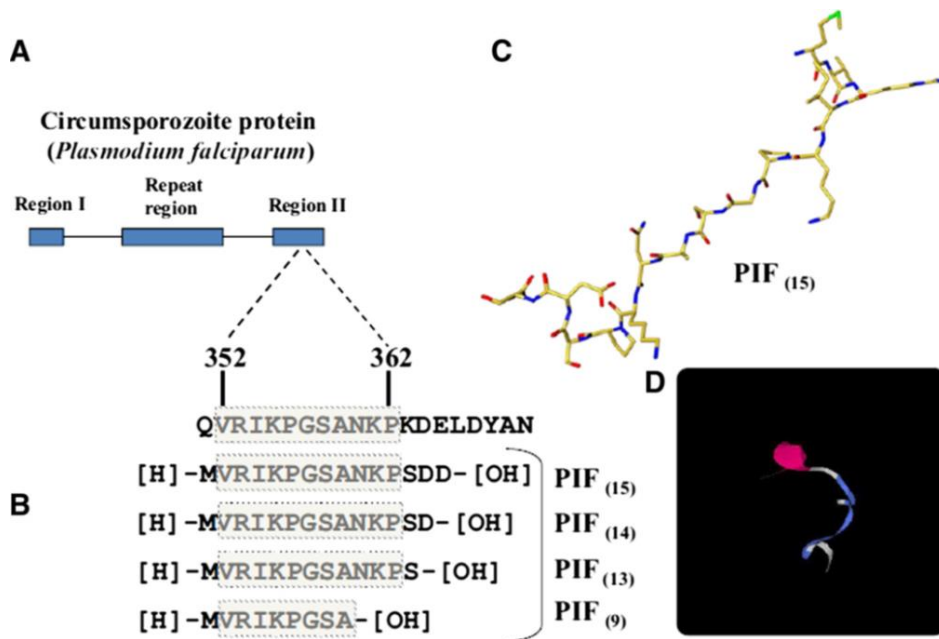


Figure 25: Structure protéique du Facteur Préimplantatoire.

D'après Barnea, 2012. A) La protéine circumprozoite de *Plasmodium falciparum* possède trois régions principales. La séquence du PIF est identique à la région II. B) Quatre isoformes du PIF ont été identifiées. La forme majoritaire est le PIF (15) qui est composé de 15 acides aminés. C et D) Prédiction de la structure du PIF en 3 dimensions.

3) Partenaires du PIF

Afin de déterminer les partenaires protéiques du PIF, l'équipe de Barnea a ensuite produit un analogue structural du PIF endogène, qualifié de **PIF synthétique (PIFs)**. Une analyse protéomique (human proteome array) réalisée à l'aide de PIFs marqué avec un fluorochrome (Alexa Fluor) a montré que le PIF interagit avec les protéines **insulin-degrading enzyme (IDE)** ainsi qu'avec le **canal potassique voltage-dépendant Kv1.3b** (Paidas et al., 2010). Une autre étude, réalisée à partir d'extraits d'embryons murins, a mis en évidence les mêmes cibles protéiques du PIF (Barnea et al., 2014). De plus, cette étude a montré que le PIF se lie principalement à trois grandes familles de protéines. D'une part, le PIF interagit avec des protéines impliquées dans le **contrôle du stress oxydatif** telles que la protein disulfide isomerase (**PDI**), la thioredoxine oxydase (**TRX**), la TRX-dependent peroxide reductase (**PRDX**) ou **Pin1**, une peptidyl-prolyl cis/trans isomerase qui bloque le stress oxydatif en réduisant la formation de NO. D'autre part, il a été montré que le PIF se lie à une seconde catégorie de protéines impliquées dans le **contrôle du repliement des protéines**, les Heat Shock Proteins (HSP). Parmi elles se trouvent les **HSP70**, **HSP90**, la BCL2 associated athanogene 3 (**BAG3**), une protéine régulatrice de l'activité de l'HSP 70 et le stress induced phosphoprotein 1 (**STIP1**) qui est une protéine adaptatrice qui régule l'activité des HSP70 et HSP90. Enfin, le PIF semble interagir avec des protéines associées **aux développements neuronal et viscéral** telles que les **tubulines** beta-5 et alpha-1, le facteur à doigt de zinc (**Zbtb45**) et la protéine polycomb Sex Comb on Midleg Homolog-1 (**SCMH1**) (Södersten et al., 2010; Yasunaga et al., 2013). Afin de valider ces résultats, les partenaires du PIF ont été étudiés à l'aide d'une colonne de chromatographie d'affinité sur laquelle du PIFs a été fixé.

En présence de lysats d'embryons murins, la fixation préférentielle du PIF à des protéines PDI, TRX ou appartenant à la famille des HSP a été confirmée.

Enfin par des approches *in silico*, il a été montré que le site actif du PIF se situe sur la séquence **M₁xRIKPxxA₉**. De plus, cette région se lie de manière optimale à une séquence consensus **RIPK** portée par les protéines partenaires du PIF. La mutagenèse *in silico* de chaque acide aminé du PIF a de nouveau mis en évidence l'importance du motif RIKP et plus particulièrement du résidu proline en position 6 (Barnea et al., 2014; Hayrabedyan et al., 2014).Figure 26.

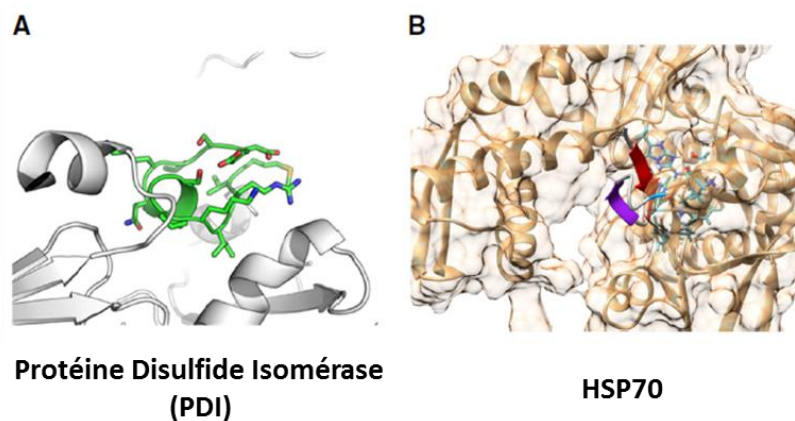


Figure 26: Liaison entre le PIF et ses partenaires protéiques.

D'après Barnea, 2014. A) Liaison prédictive entre le PIF et la protéine disulfide isomérase. B) Liaison prédictive entre le PIF et l'HSP70. Le PIF interagit avec ses protéines *via* son domaine M₁xRIKPxxA₉. La région RIPK est une séquence commune à la PDI et à l'HSP70. Modèles prédits avec le logiciel PepSite.

B- Fonctions du Facteur Préimplantatoire

a. Le PIF et la fonction immunitaire

Des dysfonctionnements de protéines partenaires du PIF telles que les HSP, les PDI ou les récepteurs potassiques Kv1.3 ont été mis en évidence dans l'apparition de pathologies auto-immunes. Par conséquent, plusieurs travaux ont été effectués afin d'évaluer les effets du PIF sur ces pathologies dégénératives en dehors de contexte de gestation.

Le diabète de type I (DID) est une maladie auto-immune qui concerne 10 % des diabètes recensés en France et dans le monde. Il est induit par l'activation anormale des lymphocytes T qui synthétisent des auto-anticorps détruisant les cellules bêta des îlots de Langerhans. Le traitement de référence actuel pour le DID est l'insulinothérapie. Cependant, de nombreux travaux tentent de trouver des solutions afin de prévenir cette maladie. L'une des approches prometteuses est l'immunothérapie. Plus précisément, cette thérapie consiste à restaurer un phénomène de tolérance immunitaire des cellules bêta des îlots de Langerhans de l'individu. Dans une étude de 2011, Weiss et collaborateurs ont montré que l'administration continue ou ponctuelle de PIFs pendant 4 semaines à des souris diabétiques non obèses réduit significativement les symptômes associés au DID. De plus, chez les souris traitées avec le PIFs, une préservation de l'architecture des îlots de Langerhans et de la sécrétion d'insuline a été mise en évidence. Cet effet protecteur du PIFs semble passer i) par une régulation de l'environnement inflammatoire et ii) par la préservation des fonctions endocrines et exocrines du pancréas. L'étude des mécanismes moléculaires a montré que le PIFs favorise la sécrétion d'interleukines de type Th1 (IL1a et IL2) et de type Th2 (IL5, IL6). Néanmoins l'analyse protéomique des cellules pancréatiques suggère que le PIF **minimise**

l'inflammation périphérique *via* l'inhibition de l'expression de protéines pro-inflammatoires telles la carbopeptidase 1, la ferritine ou l'élastase 3 connues pour être impliquée dans l'apparition du DID (Weiss et al., 2011). D'autre part, il a été montré que le PIFs **favorise la sécrétion d'insuline** *via* i) sa fixation à l'IDE et ii) l'augmentation de l'expression de l'amylase 2 (Aughsteen et al., 2005). De plus, le PIFs, en se liant à l'HSP90B1, pourrait participer à la bonne conformation de protéines pancréatiques telles que le récepteur à l'insuline. En effet l'implication de l'HSP90 dans le contrôle de la conformation du récepteur à l'insuline a été démontrée par l'équipe du Dr Bass (Ramos et al., 2007).

D'autre part, le PIF régule les processus immunitaires en se liant à différentes populations de cellules immunitaires. Plus précisément, dans un contexte sans stimulation immunitaire, le PIFs se lie préférentiellement aux monocytes naïfs CD14⁺ qui sont les précurseurs des macrophages. Ces cellules régulent la réponse immunitaire innée qui est la première ligne de défense de l'organisme. En revanche, en présence d'un agent immunogène, le PIF se lie majoritairement aux lymphocytes B (CD19⁺) et T activés (CD4⁺ et CD8⁺). Ces cellules initient la réponse immunitaire adaptative face à une agression. Enfin, le PIF semble interagir faiblement avec les cellules NK quel que soit l'environnement immunogène. (Barnea et al., 2012a). L'ensemble de ces arguments suggère que le PIF est une molécule immunomodulatoire dont l'action varie en fonction du contexte immunologique.

b. Le PIF et le neurodéveloppement

Le système nerveux a longtemps été considéré comme un organe immuno-privilégié (Barker and Billingham, 1977; Medawar, 1948). Cette notion est liée à l'existence de la barrière hémato-encéphalique (BHE) qui limite drastiquement les contacts entre les cellules immunitaires et le système nerveux central (SNC). De plus, le SNC présente une

immunosuppression constitutive apparente. Cependant, on sait aujourd'hui que dans un contexte pathologique, certaines cellules immunitaires peuvent franchir la BHE et induire des réactions immunitaires. Pour cela, ces cellules interagissent directement avec les neurones et la microglie (macrophages résidents du SNC) (Carson et al., 2006). Plus précisément, les altérations de la BHE conduisent à une inflammation chronique auto-immune, un stress oxydatif et à des défauts du repliement des protéines. Ces différentes anomalies sont retrouvées, en particulier, au cours de maladies neurodégénératives telles que les maladies d'Alzheimer, de Parkinson ou la sclérose en plaque. Dans une étude récente, un effet neuroprotecteur du PIFs a été mis en évidence dans un modèle murin d'encéphalomyélite auto-immune (Figure 27). Dans ce modèle, il a été montré que l'administration de PIFs, à l'aide d'une pompe osmotique, inhibe la neuro-inflammation, favorise la réparation neuronale et protège de la survenue de paralysie. Pour exercer ces effets protecteurs, le PIFs inhibe la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires circulantes de types Th1 tels que l'IL12 ou l'interféron γ (INF γ). De plus, le PIFs semble limiter l'accès de la corde spinale aux cellules inflammatoires en favorisant la réparation de la gaine de myéline (Weiss et al., 2012). Dans deux autres études, les auteurs ont induit des lésions cérébrales en injectant du LPS à des rats 3 jours après leur naissance. Puis les animaux ont été traités, entre les 6^{ème} et 13^{ème} jours après la naissance, par du PIFs.

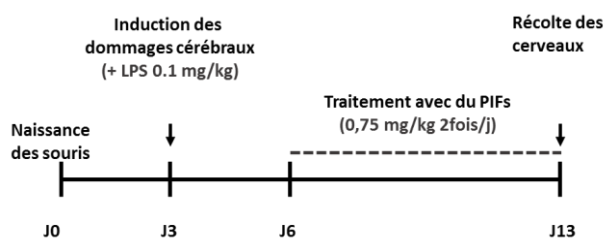


Figure 27: Schéma expérimental des effets *in vivo* du PIFs sur le neuroprotection.

D'après Mueller et al, 2014.

Une diminution de la mort neuronale et de l'activation de la microglie a été observée chez les rats traités avec le PIFs. Ces effets ont été associés à une inhibition de l'expression du micro-ARN Let-7. Le PIF semble bloquer la stabilisation du complexe KSRP (KH-type splicing regulatory protein) qui est nécessaire à la biogenèse de Let-7 (Mueller et al., 2014). Cet effet est dépendant des récepteurs Toll-like 4 (TLR4). Les TLR sont des récepteurs transmembranaires activés par des molécules d'origine microbienne. Ils participent à la réponse immunitaire innée. Parallèlement, il a été montré que l'augmentation de la sécrétion de Let-7 par des cellules cérébrales endommagées est associée à des pathologies neurodégénératives (Lehmann et al., 2012). Ainsi, le PIFs pourrait exercer un effet neuroprotecteur en contrôlant l'expression de Let-7. Les mêmes auteurs ont également montré que le PIFs exerce son effet neuroprotecteur en inhibant l'apoptose des neurones *via* un contrôle de Bcl2. De plus, le PIFs favorise la croissance neuronale en activant les voies PKA/PKC, toujours de manière TLR4 dépendante (Mueller et al., 2015).

L'ensemble de ces observations montre clairement les capacités du facteur PIF à réguler des processus inflammatoires et immunomodulateurs impliqués dans des pathologies dégénératives. Un premier essai clinique a été réalisé chez des femmes souffrant d'hépatites auto-immunes. Elles ont reçu une dose journalière de PIFs pendant 5 jours. Cet essai clinique menée par l'université de Miami a été approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) et est actuellement en phase 1b. Au cours de cette phase, la non toxicité, la tolérance et la pharmacocinétique du PIFs seront évaluées.

c. Le PIF et le stress oxydatif

Comme décrit dans le chapitre VI.A.3, l'une des principales partenaires du PIF est la PDI. Cette enzyme appartient à la famille des thiols oxydo-réductases. Elle joue un rôle majeur de

chaperonne et est impliquée dans le contrôle du stress oxydatif. Dans une étude publiée en 2013, les auteurs ont utilisé un modèle de souris immuno-déprimées, sujettes à une réaction aiguë du greffon contre l'hôte. Cette complication, fréquemment observée lors de greffe de moelle, implique une activation de la réponse inflammatoire de type 1 et une activation immunitaire délétère. Ces souris ont été traitées par le PIFs pendant 3 jours. Les auteurs montrent que le PIF inhibe l'expression de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) et la sécrétion de NO (Azar et al., 2013). L'effet protecteur du PIF vis-à-vis du stress oxydatif a également été mis en évidence dans les modèles de DID et de neuro-dégénérescence (Mueller et al., 2014; Weiss et al., 2012).

C- PIF et fonctions de reproduction

1) Le PIF et le développement embryonnaire

Après la mise en évidence de l'origine embryonnaire du PIF, l'équipe de Stamatkin a tenté de déterminer la cinétique de sécrétion du facteur au cours du développement embryonnaire. Dans une première étude publiée en 2011, les auteurs ont montré que i) le PIF est sécrété par les embryons murins et bovins à partir du stade de 2 cellules, ii) le PIF est sécrété par les embryons viables uniquement et iii) cette sécrétion est de l'ordre du ng/ml. En revanche, le PIF n'est pas sécrété par les embryons atrétiques. Ces observations suggèrent que les taux de PIF endogènes sécrétés dans les milieux de culture sont associés au bon développement embryonnaire. Afin de valider cette hypothèse, les auteurs ont, dans un premier temps, neutralisé le PIF endogène par l'ajout d'un anticorps monoclonal (anti-PIF-mAc) dans les milieux de cultures d'embryons murins en F.I.V. Une augmentation du nombre d'embryons atrétiques, dépendante de la quantité d'anti-PIF-mAc ajoutée, a été observée au cours de la

neutralisation (Stamatkin et al., 2011a). Dans un second temps, cette même équipe a étudié le potentiel rôle autocrine du PIF. Les auteurs ont montré que l'addition de PIFs, dans des milieux de culture embryonnaires contenant du sérum de femmes présentant des fausses couches à répétition (toxiques pour l'embryon), augmente le nombre d'embryons viables (Stamatkin et al., 2011b). Enfin, afin de valider l'effet autotrophe du PIF sur l'embryon, les auteurs ont utilisé le modèle de culture *in vitro* d'embryons bovins. Les embryons ont été cultivés en présence ou en absence de PIFs pendant les trois premiers jours de développement. Le développement des embryons a été observé 3 jours et 7 jours après la F.I.V (Figure 28).

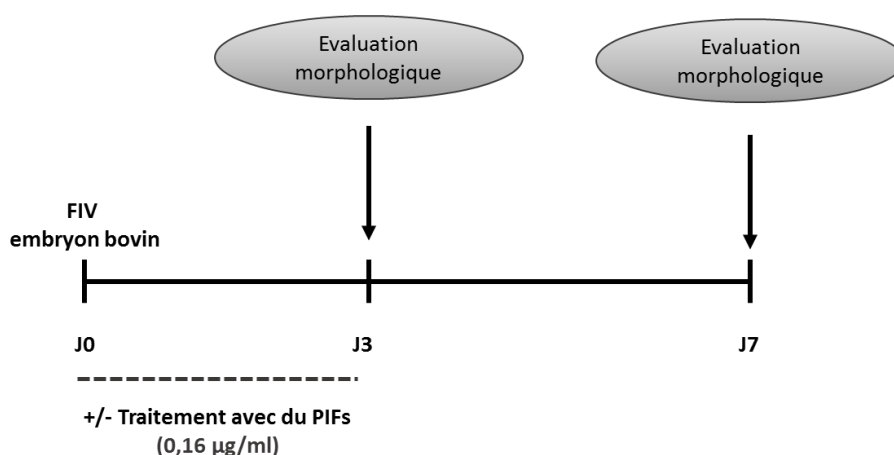


Figure 28: Schéma expérimental des effets *in vitro* du PIFs sur le développement embryonnaire.

D'après Stamatkin et al, 2011.

Aucune différence significative n'a été observée entre le groupe traité par le PIFs et le groupe non traité après 3 jours de culture. Néanmoins, l'observation des embryons, après 7 jours de culture a montré une augmentation significative du nombre d'embryons au stade

de blastocystes en présence de PIFs. Les auteurs suggèrent que le PIFs ajouté dans le milieu de culture a stimulé la production de PIF endogène et donc le développement embryonnaire (Stamatkin et al., 2011b).

2) Rôles du PIF dans la fonction endométriale

Après la mise en évidence de l'effet autocrine du PIF sur l'embryon, des chercheurs se sont intéressés au potentiel effet paracrine du PIF sur l'endomètre utérin en période pré-implantatoire. Par des approches génomiques et protéomiques, l'équipe de M. Paidas a montré que le PIFs régule des gènes et des protéines impliqués dans les voies de l'immunité, de l'apoptose, de l'adhésion cellulaire et de la réceptivité endométriale.

a) Voies de l'immunité

Dans un premier temps, les auteurs ont réalisé une puce d'expression à partir d'ARN provenant de **cellules stromales endométriales humaines décidualisées *in vitro* (hESC)**, cultivées en présence ou en absence de PIFs. L'analyse bio-informatique de la puce d'expression indique un potentiel effet du PIFs sur l'environnement inflammatoire et immunitaire des cellules endométriales humaines. Parmi les gènes fortement dérégulés se trouve le récepteur à l'interleukine 1 associé à la protéine kinase 1 (IRAK1BP1) dont l'expression est augmentée 53 fois en présence de PIFs. La génération de souris invalidées pour ce récepteur a permis de montrer qu'IRAK1BP1 inhibe la signalisation des TLR. Ces récepteurs médient des effets pro-inflammatoires. IRAK1BP1 exerce un effet anti-inflammatoire en favorisant la tolérance immunitaire. Plus précisément, IRAK1BP1 stimule la sécrétion d'IL10 par les macrophages (Conner et al., 2010). De plus, le PIFs diminue fortement l'expression du gène de la sous-unité bêta du récepteur à l'interleukine 12

(IL12RB2). IL12RB2 est un récepteur associé aux réponses pro-inflammatoires de type Th1 induites par l'IL12. Enfin, les hESC maintenues en culture primaire en présence de PIFs, sécrètent de plus grandes quantités d'IL8 (x 82), d'IL1 β (x 7) et d'IL6 (x 11). Ces résultats suggèrent que le PIF augmente la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dans les cellules endométriales. Ainsi, le PIFs semble réguler la balance cytokinique Th1/Th2 dans le tissu endométrial. En période pré-implantatoire, le PIF pourrait participer à la mise en place d'un environnement pro-inflammatoire favorable à l'implantation du futur embryon.

b) Voies de l'apoptose

L'apoptose des cellules endométriales est un processus physiologique favorable à l'implantation embryonnaire. La culture des hESC en présence de PIFs est associée à une diminution de l'expression de Bcl2. De plus le PIF augmente l'expression de MDM2 (x5) et de BL6 Corepressor (BCOR x4). BCOR est un facteur de transcription indispensable à la fonction et à la survie des cellules immunitaires. BCOR est aussi connu pour participer au développement embryonnaire précoce (Wamstad et al., 2008). En conclusion, en période pré-implantatoire, le PIF exerce un effet pro-apoptotique sur les cellules endométriales.

c) Voies de l'adhésion cellulaire

Les cultures humaines ESC cultivées en présence de PIFs expriment de manière plus importante la protéine Down syndrome Cell Adhesion Molecule Like 1 (DSCAML1), la protéine Sorbin and SH3 domain containing 2 (SORBS2) et la connexine 45. DSCAML1 est essentiellement décrite pour son rôle dans la différenciation et la migration neuronales. SORBS2 est une protéine associée au cytosquelette qui interagit avec l'actine. Le PIF semble également augmenter l'expression des intégrines ITGA2 et ITGB1 et au contraire diminuer

l'expression de l'ITGA9. Ces différentes protéines d'adhésion cellulaire, dont l'expression est régulée par le PIF, participent à la communication entre les cellules endométriales et les cellules trophoblastiques. Elles transmettent en particulier des signaux qui régulent la migration trophoblastique. Ainsi, le PIF pourrait participer au dialogue entre les cellules endométriales et trophoblastiques.

d) Voies de la réceptivité utérine

Dans un second temps, l'équipe de M. Paidas s'est intéressée à l'effet du PIF sur la réceptivité des cellules épithéliales utérines sur un modèle de cellules endométriales épithéliales prélevées en début de phase lutéale et cultivées en présence ou en absence de PIFs. Il a été montré que ce facteur induit une augmentation dose dépendante de l'expression de l'intégrine ITGA2B3. Cette intégrine est fortement associée à l'acquisition de la réceptivité utérine (Lessey, 2002). Cet effet sur l'expression de l'intégrine $\alpha 2\beta 3$ n'a pas été observé dans les cellules stromales endométriales suggérant ainsi un effet favorable et spécifique du PIF sur la réceptivité utérine des cellules épithéliales. De plus, il a été montré que le PIFs induit une augmentation de l'expression des gènes codant pour l'amphiréguline et pour l'épiréguline. Ces deux protéines appartiennent à la famille de l'Epidermal Growth Factor (EGF). Elles interagissent avec le récepteur à l'EGF et semblent être impliquées dans la mise en place de la réceptivité utérine (Das et al., 1995; Giudice, 1999).

3) Rôles du PIF dans la circulation maternelle

La première identification du PIF a été effectuée dans le sérum de femmes enceintes. Une autre étude prospective a été réalisée sur des sérums provenant de 57 femmes sujettes à des fausses couches précoces et de 23 femmes enceintes suite à une F.I.V. La présence de

PIF a été analysée par LPBA quatre jours après le transfert embryonnaire. Des dosages d'hCG ont été réalisés en parallèle pour chaque prélèvement. Sur les 57 sérums de femmes présentant une fausse couche, 75 % n'ont pas montré d'activité pour le PIF. En revanche, 100 % des sérums contrôles montrent une activité positive pour le PIF. Parmi les 57 patientes, les sérums de 15 d'entre-elles ont été analysés par LPBA chaque semaine pendant le 1^{er} trimestre de grossesse. 27 % d'entre elles présentaient une activité PIF positive au cours de la grossesse. En revanche, deux semaines avant la fausse couche, le sérum de ces femmes ne présentait plus d'activité du PIF. Chez ces 15 patientes, les taux d'hCG sont restés élevés et détectables dans la circulation maternelle au moment de la fausse couche. Cette étude démontre que le PIF est présent dans la circulation maternelle tout au long du premier trimestre de grossesse et uniquement au cours de grossesses évolutives. En conclusion, il apparaît que le PIF pourrait être utilisé comme un biomarqueur du bon déroulement de la grossesse (Coulam et al., 1995).

En 2012, une étude *in vitro*, réalisée sur des sérums de femmes présentant des fausses couches spontanées incubés en présence de PIF, a montré une diminution de l'activité cytotoxique des cellules NK circulants. **Cet effet protecteur du PIF est associé à l'inhibition de l'expression du cluster de différenciation CD69 exprimé à la surface des cellules NK** (Roussev et al., 2013). Les échecs répétés d'implantation chez la femme ont été associés à une augmentation de l'expression de CD69 et de l'activité cytotoxique des NK (Coulam and Roussev, 2003; Ntrivalas et al., 2001). Enfin, une étude réalisée dans le modèle bovin, à l'aide d'un test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) quantitatif, a permis de montrer une corrélation positive entre la présence de PIF dans le sérum maternel et le développement de l'embryon au cours de grossesses évolutives (Stamatkin et al., 2011a). De

plus, dans cette étude, la présence de PIF dans la couche trophoblastique d'embryons bovins a été démontrée. Ceci suggère qu'il existe peut-être un relais de la production de PIF embryonnaire par le placenta, en phase post-implantatoire, qui aboutirait au relargage du facteur dans la circulation maternelle.

Deuxième Partie :

Démarche

expérimentale

et Résultats

1) Présentation du laboratoire

J'ai réalisé ma thèse à l'Université de Versailles Saint-Quentin en Yvelines (UVSQ), dans l'équipe d'accueil EA7404, Gamètes-Implantation-Gestation (GIG), dirigée par le Pr François Vialard. Composée de personnels hospitalo-universitaires et universitaires, cette équipe travaille en étroite collaboration avec le Centre Hospitalier Intercommunal de Poissy-Saint-Germain en Laye (CHIPS). Les thématiques de recherche du GIG visent à préciser l'impact du micro-environnement (*in vivo* et *in vitro*) sur le développement embryonnaire et le déroulement de la grossesse. Dans ce contexte, l'équipe est divisée en trois groupes de travail. L'**équipe Gamètes** tente de déterminer s'il existe ou non une étiologie ou une prédisposition génétique et/ou épigénétique de susceptibilité à l'infertilité. Les mécanismes conduisant à la constitution d'une anomalie morphologique particulière du spermatozoïde (les vacuoles) sont étudiés, de même que les gènes et mécanismes impliqués dans les anomalies gamétiques. L'**équipe Implantation** étudie les mécanismes impliqués dans l'implantation embryonnaire humaine. Elle s'intéresse plus particulièrement aux effets des adipokines (leptine et adiponectine) et du Facteur PréImplantatoire (PIF) mais également aux effets de l'environnement maternel (obésité) dans le développement normal et pathologique du placenta humain. D'autre part, elle s'intéresse à la régulation de la différenciation et de la réceptivité de l'endomètre maternel. Cette équipe tente de comprendre les mécanismes impliqués dans le dialogue entre le fœtus et l'endomètre afin de prévenir et traiter des femmes présentant des pathologies telles que les échecs d'implantation, les fausses couches à répétition, la pré-éclampsie et le retard de croissance intra-utérin. L'**équipe Gestation** s'intéresse d'une part au diagnostic précoce des pathologies génétiques de l'embryon, du fœtus et de l'enfant et d'autre part au passage transplacentaire

de molécules entre la mère et le fœtus. Les travaux du laboratoire portent essentiellement sur des modèles cellulaires humains (spermatozoïdes, ovocytes, placenta, endomètre). L'équipe est aujourd'hui en étroite collaboration avec l'UMR 1198 (Biologie de la Reproduction (BDR)) de l'INRA de Jouy en Josas dirigée par le Dr Corinne Cotinot. Ce rapprochement permet d'élargir nos thématiques de recherche en utilisant des modèles animaux.

2) Collaborations

Dans le cadre de ma thèse, j'ai pu établir des collaborations avec différentes équipes. Ces échanges m'ont permis d'appréhender de nouvelles techniques, d'étendre les collections d'échantillons biologiques humains et de poursuivre mes travaux sur des modèles animaux.

2.1. La plateforme de protéomique Protim de l'Université Rennes I dirigée par le Dr Charles Pinault.

Cette plateforme développe essentiellement des solutions innovantes en imagerie par spectrométrie de masse MALDI pour la toxicologie mécanistique et réglementaire et pour la recherche *in situ* de biomarqueurs de pathologie. Ce laboratoire possède une expertise dans le développement de test immunologique ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Cette collaboration m'a permis de participer activement au développement d'anticorps monoclonaux murins dirigés contre le PIF. Le développement de ces anticorps a été confié à la société Biotem. Au sein du laboratoire Protim, j'ai pu effectuer le criblage des hybridomes, valider le choix des anticorps à produire et enfin initier le développement d'un test ELISA à visée diagnostique.

2.2. Les équipes de Gynécologie et Obstétrique, le centre de Prélèvement, le service d'Anesthésie et le laboratoire de Biologie Médicale du Centre Hospitalier de Poissy Saint-Germain.

Ces collaborations m'ont permis d'initier un protocole de recherche clinique au sein du CHIPS. J'ai pu rencontrer et suivre des patientes tout au long de leurs grossesses normales ou pathologiques. Ainsi, j'ai pu mettre en place une sérothèque composée de prélèvements récoltés à différents temps de la grossesse. Cet essai clinique vise à quantifier le PIF circulant dans des sérums maternels au cours de la grossesse.

2.3. Le laboratoire d'Anatomie et Cytologie pathologiques du centre de Poissy Saint-Germain en Laye dirigé par le Dr Christophe Duboucher. Cette collaboration m'a permis de mettre au point un protocole d'immunomarquage du PIF sur des coupes de placentas humains à l'aide d'un automate d'immuno-histologie.

2.4. Les laboratoires d'Assistance Médicale à la Procréation des hôpitaux de Poissy Saint Germain en Laye (Poissy), de Jean Verdier (Bondy) et de la clinique Pasteur (Brest). Ces collaborations m'ont permis de récupérer des surnageants de cultures embryonnaires issus de F.I.V. De plus, pour chaque prélèvement, j'ai pu collecter des renseignements cliniques dont les issues de grossesses.

2.5. Le département d'Immunologie de la Reproduction de l'académie des Sciences (Sofia, Bulgarie), dirigé par le Pr Pavel Rashev. Cette collaboration m'a permis d'obtenir des échantillons de placentas et d'utérus porcins prélevés au cours de la période pré-implantatoire.

2.6. Le Dr Eytan Barnea directeur scientifique de la société BioIncept (New Haven, Etats Unis) qui nous a fourni le PIF synthétique (PIFs) et les premiers anticorps anti-PIF utilisés au laboratoire.

2.7. Les équipes de l'UMR 1198 (BDR) : « Environnement maternel et développement péri-implantatoire » dirigée par les Dr Olivier Sandra et Gilles Charpigny et « **Placenta environnement et programmation des phénotypes** » dirigée par le Dr Pascale Chavatte-Palmer. Ces collaborations devraient permettre de préciser la localisation et les fonctions du PIF au cours de la gestation dans les modèles bovins et porcins.

Par ailleurs, j'ai mis en place une collaboration avec le Dr Sperandino Markus (Université Ludwig-Maximilians à Munich) pour la fourniture d'anticorps anti-PIF synthétisés par Protim et avec le Dr Michael Paidas (Université de Yale à New Haven) pour la fourniture du protocole d'immunohistochimie du PIF sur des coupes en paraffine que j'ai mis au point au cours de ma thèse.

3) Contexte de la recherche

En 2012, au début de nos travaux sur le Facteur Préimplantatoire, les connaissances sur ce peptide et ses potentiels rôles à l'interface fœto-maternelle étaient très mal connues.

Une seule étude préliminaire, réalisée en 2010, démontre que le PIF synthétique (PIFs), un analogue structural du PIF endogène, favorise le pouvoir invasif des cellules HTR-8/SVneo (Duzyj et al., 2010). Cette lignée cellulaire issue de trophoblastes extravilloux immortalisés par le virus simien 40 (SV-40) représente un bon modèle pour l'étude du phénomène d'invasion trophoblastique. En parallèle, des analyses génomiques et protéomiques réalisées sur des cellules endométriales humaines cultivées en présence de PIFs, suggèrent que ce

peptide favorise l'implantation des embryons en régulant, en particulier, l'expression de facteurs d'adhésion et des cytokines pro-inflammatoires (Paidas et al., 2010; Barnea et al., 2012b).

Afin de déterminer l'orientation de nos travaux sur le rôle du PIF à l'interface fœto-maternelle, nous avons caractérisé, dans un premier temps, la distribution de ce peptide dans le placenta humain tout au long de la grossesse. Nous avons, par des analyses immunohistochimiques, étudié la présence du PIF sur des coupes de placentas de 1^{er} trimestre issus d'interruption volontaire de grossesse et de 3^{ème} trimestre issus de grossesses non pathologiques. Par cette approche, nous avons pu montrer que le PIF est exprimé dans les cellules trophoblastiques et plus particulièrement dans les CTEV.

A partir de ces observations, nous avons décidé d'étudier les rôles de ce facteur dans le contrôle du processus d'invasion trophoblastique. Nous avons utilisé le modèle de culture primaire de trophoblastes extravilleux humains issus de placentas de 1^{er} trimestre.

Dans un second temps, nous avons entrepris une approche globale afin d'approfondir les mécanismes moléculaires par lesquels ce facteur influence la placentation humaine. **Cette étude nous a conduits à explorer le rôle du PIF dans l'apoptose trophoblastique.** Dans ce travail, nous avons utilisé le modèle de culture primaire de cytotrophoblastes extravilleux (CTEV) et la lignée humaine trophoblastique HTR-8/SVneo.

Enfin, dans un dernier temps, nous nous sommes intéressés à la potentielle **implication de ce facteur dans l'apparition de pathologies** de la grossesse liées à des défauts de la placentation tels que le RCIU associé ou non à la PE.

Article 1

Localisation du Facteur Préimplantatoire au cours de la grossesse humaine et rôle dans l'invasion trophoblastique

Article 1

Preimplantation Factor (PIF) Promotes Human Trophoblast Invasion

Hadia Moindjie, Esther Dos Santos, Laurence Loeuillet, Héloïse Gronier, Philippe de Mazancourt, Eytan R. Barnea, François Vialard, and Marie-Noëlle Dieudonné.

BIOLOGY OF REPRODUCTION (2014) 91(5):118, 1–10

I- Introduction

L'implantation embryonnaire et la placentation représentent des étapes critiques dans la mise en place d'une grossesse. Trois semaines après la fécondation, la villosité choriale sous sa forme définitive est en place et les cytotrophoblastes, qui sont les cellules clés du développement placentaire, se sont différenciés en deux sous populations : les trophoblastes villeux (CTV) et les trophoblastes extravilleux (CTEV). Les CTV sont capables de fusionner entre eux et de créer un syncytium appelé le syncytiotrophoblaste (ST). Ce ST, en contact direct avec la circulation maternelle, permet les échanges entre la mère et le fœtus et assure la fonction endocrine du placenta. Les CTEV se différencient au cours de l'implantation embryonnaire et acquièrent en particulier un phénotype invasif. Ainsi, ces cellules assurent l'ancrage du placenta dans l'utérus maternel et le remodelage des artères spiralées utérines en artères utéroplacentaires de large calibre, régulant ainsi un afflux sanguin adéquat au cours du développement placentaire. L'invasion de l'endomètre par les CTEV requiert différentes étapes dont l'interaction entre les CTEV et les composants de la matrice extracellulaire endométriale. La dégradation de cette matrice permet l'enfouissement des CTEV et leur migration au sein du tissu maternel. Dans ce processus d'invasion, la régulation de la balance entre l'expression des métalloprotéases (MMP) et de leurs inhibiteurs tissulaires (TIMP) au site d'implantation de l'embryon est primordiale. En parallèle, l'acquisition d'un phénotype invasif des CTEV est associé à l'expression de nouvelles protéines de surfaces telles que les intégrines $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 1\beta 1$ ou $\alpha v\beta 3$.

Le Facteur PréImplantatoire (PIF) est décrit comme un facteur d'origine embryonnaire aux propriétés immuno-modulatrices. Détectable dans la circulation sanguine maternelle dans le modèle bovin, la sécrétion du PIF dans le sang semble être corrélée avec une grossesse

évolutive. Les facultés du PIF à moduler des processus inflammatoires et immunomodulateurs, tous deux nécessaires à une bonne implantation embryonnaire ainsi que sa présence à l'interface foëto-maternelle, laissent à penser que ce facteur puisse jouer un rôle dans le développement précoce du placenta.

Dans ce premier article, nous avons étudié le rôle du PIFs sur l'invasion trophoblastique de CTEV isolés à partir de placentas humains de 1^{er} trimestre.

II- Résultats et Discussion

Dans un premier temps nous avons caractérisé l'expression protéique du PIF dans des coupes de placentas humains tout au long de la grossesse. Cette approche immunohistochimique nous a permis de mettre en évidence que ce facteur est bien présent dans le placenta humain et plus précisément à la bordure des villosités choriales. De plus, nous avons montré que le PIF est essentiellement présent dans le placenta de 1^{er} trimestre. La présence du PIF diminue progressivement à partir de la 12^{ème} semaine de gestation et jusqu'à la fin de la grossesse. L'analyse du marquage immunohistochimique autour du site d'implantation de l'embryon, montre que le PIF est présent dans le cytoplasme des cellules trophoblastiques et de manière plus intense dans les trophoblastes extravilloux.

Dans un second temps, nous avons mesuré le taux d'invasion de CTEV cultivés en présence de doses croissantes de PIFs (10-100nM) pendant 48 h. Pour cela, nous avons réalisé des tests d'invasion de CTEV à travers une couche de Matrigel déposée dans une chambre de Boyden. Par cette approche, nous avons montré que la culture de CTEV en présence de PIFs induit une augmentation du pouvoir invasif des CTEV aux doses de 50 et 100nM pour un effet maximal à la dose de 50nM (+108 %). En parallèle, nous avons étudié l'effet du PIFs sur

la prolifération trophoblastique en utilisant l'immunomarquage de l'antigène nucléaire Ki67 présent uniquement dans les cellules en division. Ainsi, nous avons montré que cet effet pro-invasif n'est pas associé à un effet prolifératif.

Dans un second temps, nous avons tenté de mettre en évidence les mécanismes moléculaires impliqués dans l'effet pro-invasif du PIFs dans les CTEV. Pour cela, nous avons exploré les effets de ce facteur sur la sécrétion et l'activité des métalloprotéases 2 et 9 (MMP-2 et MMP-9 respectivement) sécrétées par les cellules trophoblastiques. Par une approche de zymographie, nous avons montré que le PIFs augmente significativement l'activité de la MMP-9 (+59 %) mais n'a pas d'effet sur la MMP-2. En parallèle, nous avons montré par RT-PCR quantitative que le traitement des CTEV par du PIFs à 50nM induit une diminution de l'expression de TIMP-1, l'inhibiteur préférentiel de la MMP-9 (-26 %). Toujours par RT-PCR quantitative, nous avons étudié l'expression des intégrines associées à l'acquisition d'un phénotype invasif. Par cette approche, nous avons montré que le PIFs induit i) une augmentation significative de l'expression des intégrines αv (+25%) et $\alpha 1$ (+32 %) après 24 h de culture et ii) une diminution de ces mêmes intégrines après 48h de traitement.

Enfin, nous avons tenté de mettre en évidence la ou les voie(s) de signalisation impliquée(s) dans l'effet pro-invasif du PIFs. Pour cela, nous avons réalisé des tests d'invasion en présence de PIFs et/ ou d'inhibiteurs pharmacologiques des principales voies de signalisation connues pour être impliquées dans l'invasion des CTEV. Ainsi nous avons pu montrer que l'effet pro-invasif du PIFs dans les CTEV met en jeu les voies MAPK, PI3K et JAK-STAT.

En conclusion, au cours de ce travail nous avons montré que le PIF est présent dans le placenta humain et plus précisément dans les cellules trophoblastiques. Nous avons mis en

évidence un effet pro-invasif du PIFs sur les CTEV suggérant un rôle positif du PIF sur l'implantation embryonnaire.

Afin de préciser les fonctions de ce peptide dans le développement précoce du placenta, nous avons réalisé une analyse globale de l'expression des gènes et des processus biologiques associés régulés par le PIFs, dans les trophoblastes humains du premier trimestre de grossesse.

Article 2

Analyse globale des gènes régulés par le Facteur Préimplantatoire et effets du PIF sur l'apoptose trophoblastique

Article 2

Prelimplantation Factor is an anti-apoptotic effector in human trophoblasts involving p53 signaling pathway

Hadia Moindjie, Esther Dos Santos, Rita-Josiane Gouesse, Nelly Swierkowski-Blanchard, Valérie Sérazin, Eytan R. Barnea, François Vialard, and Marie-Noëlle Dieudonné.

CELL, DEATH AND DISEASE, *in press*

I- Introduction

La placentation représente une étape cruciale dans l'établissement d'une grossesse. Un équilibre entre la prolifération, la différenciation et la mort trophoblastique est nécessaire pour le développement d'un placenta fonctionnel. L'apoptose est un processus actif indispensable pour un renouvellement normal des cellules trophoblastiques. Le gène TP53 code pour le facteur de transcription p53, qui en réponse à divers stress cellulaires, a la capacité de se stabiliser dans le noyau puis d'activer ou d'inhiber l'expression de ses nombreux gènes cibles. Ainsi, p53 contrôle la progression du cycle cellulaire, l'induction de l'apoptose ou la réparation de l'ADN. Parmi ses nombreuses cibles, p53 régule l'expression de certaines protéines pro-apoptotiques telles que Bax et Bak ou anti-apoptotiques telles que Bcl2. L'apoptose emprunte deux voies, la voie extrinsèque et la voie intrinsèque. La voie extrinsèque dépend de la fixation de ligands de mort, tel que FasL, à des récepteurs de la mort, tel que Fas. La voie intrinsèque dite « mitochondriale » fait intervenir l'activation de l'expression des gènes pro-apoptotiques de la famille de Bcl2. Ces facteurs induisent la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe et le relargage de cytochrome c dans la cellule. La libération du cytochrome c provoque alors l'activation de la cascade des caspases effectrices 3, 6 et 7 qui induisent la mort de la cellule. Des manifestations morphologiques de l'apoptose telles que la perméabilisation des membranes plasmiques et la fragmentation de l'ADN sont observées dans des placentas issus de grossesses non pathologiques. Néanmoins, une augmentation de l'apoptose a été observée dans des placentas issus de grossesses pathologiques telles que la pré-éclampsie (PE) ou le retard de croissance intra-utérin (RCIU) en comparaison avec des placentas contrôles.

Dans cette seconde étude, nous avons tenté de préciser les rôles du PIF dans le placenta humain en utilisant une approche transcriptomique.

II- Résultats et Discussion

Nous avons réalisé une puce d'expression à partir d'ADNc issus de CTEV humains maintenus en culture primaire et traités ou non avec le PIFs (50 nM). L'analyse IPA (Ingenuity Pathway) des gènes présentant une modification d'expression a permis de mettre en évidence les voies cellulaires affectées par le traitement des CTEV par le PIFs. Cette analyse indique un effet du PIFs sur l'expression de 34 gènes impliqués dans des phénomènes de cancérisations. Parmi les gènes régulés différemment, 14 sont impliqués dans le contrôle de la croissance cellulaire et de la prolifération et 6 dans les phénomènes de la mort cellulaire, de la réplication, de la recombinaison et de la réparation de l'ADN.

Nous avons complété cette analyse par une approche Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). Nous avons mis en évidence une association entre le PIFs et des groupes de gènes associés au processus de cancérisation, aux voies de l'immunité et des canaux ioniques. Les analyses des gènes différemment exprimés et de leurs interactions, à l'aide des logiciels DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discover) et KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), ont permis de définir des catégories fonctionnelles affectées par le PIFs. Parmi elles, les voies associées à des processus immunitaires et de cancérisation ont été de nouveau identifiées. Enfin, de manière plus surprenante, la voie de signalisation des récepteurs olfactifs semble être également modulée par le PIFs.

Ces analyses bio-informatiques suggérant un rôle du PIF dans l'apoptose trophoblastique, nous avons étudié l'effet du PIFs à différentes doses sur l'apoptose des cellules trophoblastiques humaines CTEV et issues de la lignée HTR-8/SVneo.

Dans un premier temps, en mesurant l'activité des lactates deshydrogénases sécrétées par les CTEV et les cellules HTR-8/SVneo cultivées en présence de PIFs pendant 48 h, nous avons montré que ce peptide n'affecte pas la viabilité cellulaire. A l'aide des marquages annexinV-FITC et TUNEL, nous avons montré que le PIFs induit une diminution significative du taux d'apoptose dans les HTR-8/SVneo. La mesure des effets du PIFs sur l'expression des cibles transcriptionnelles de p53 dans les CTEV a mis en évidence une augmentation de l'expression i) de Bcl2 (+62 % et +64 % respectivement) et ii) de MDM2 (+35 % et +89 % respectivement). Dans les cellules HTR-8/SVneo, nous avons mis en évidence que le PIFs (aux doses de 50 et 100nM) induit une augmentation de l'expression de Bcl2 (+26 % and +32 % respectivement) et une diminution des expressions de Bax (-25 % aux deux doses de PIFs testées) et de Bak (-17 % aux deux doses de PIFs testées). Nous avons également montré, dans les cellules HTR-8/SVneo, que le PIFs induit une augmentation de l'expression protéique de Bcl2 et une diminution de l'expression protéique de Bax. Afin de déterminer si l'effet anti-apoptotique du PIFs est dépendant de p53, nous avons invalidé l'expression du gène TP53 dans les cellules HTR-8/SVneo. Dans ces conditions, nous avons montré la disparition des effets du PIFs sur l'expression des gènes Bcl2 et Bax. Par ailleurs nous avons montré que le PIFs n'affecte pas l'expression protéique de p53 mais inhibe sa phosphorylation sur la sérine 15 (-35 % pour la dose de PIFs à 100nM). L'ensemble de ces résultats suggèrent que p53 est impliqué dans l'effet anti-apoptotique du PIFs. Enfin, nous avons réalisé des immunomarquages du PIF dans des placentas issus de grossesses avec PE

ou RCIU. Une étude semi-quantitative a permis de montrer une diminution du marquage du PIF dans les placentas pathologiques en comparaison avec des placentas contrôle de même terme.

En conclusion, au cours de cette étude nous avons mis en évidence un effet du PIFs dans la survie trophoblastique au cours des premières étapes de la grossesse humaine. Nous avons aussi montré, par une approche transcriptomique, un rôle du PIFs sur le contrôle de l'expression de gènes liés aux fonctions immunitaires dans les CTEV suggérant un effet bénéfique du PIF au cours de la placentation.

Article 3

Le Facteur Préimplantatoire protège de la pré-éclampsie : Il favorise l'invasion trophoblastique et inhibe le stress oxydatif

Review

Preimplantation Factor (PIF) endogenously prevents preeclampsia: Promotes trophoblast invasion and reduce oxidative stress

Eytan R. Barnea, François Vialard, Hadia Moindjie, Sara Ornaghi, Marie-Noëlle Dieudonné, and Michael J. Paidas.

JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY (2015)
doi :10.1016/j.jri.2015.06.002

I- Introduction

Le succès d'une grossesse est le fruit d'une communication efficace entre l'embryon et l'utérus maternel. Pour cela, l'embryon joue un rôle actif notamment en exprimant et en sécrétant différents signaux spécifiques qui permettent de réguler leur implantation au sein d'un endomètre réceptif. Un défaut de communication engendre l'apparition de pathologies de la grossesse telles que les fausses couches à répétition, le retard de croissance intra-utérin (RCIU) ou le syndrome de pré-éclampsie. La pré-éclampsie (PE) est une pathologie unique qui n'existe que dans l'espèce humaine. Cette affection, qui touche 5 % des grossesses, est initiée dans les stades précoces de la grossesse mais les premières manifestations cliniques apparaissent, au plus tôt, au milieu du second trimestre de la grossesse. Une prévention de cette pathologie pourrait être envisagée et initiée dès le 1^{er} trimestre de la grossesse notamment grâce à la mesure de biomarqueurs spécifiques.

Le PIF est un peptide d'origine embryonnaire de 15 acides aminés. Il semble être nécessaire au développement embryonnaire car sa neutralisation, par l'ajout d'anticorps anti-PIF dans le milieu de culture d'embryons murins, entraîne une diminution du taux d'embryons viables. Au contraire, l'ajout de PIFs dans le milieu de culture d'embryons bovins aboutit à une augmentation du taux d'embryon évolutifs. Une étude publiée en 2014, a permis d'identifier certaines cibles protéiques du PIF dans l'embryon telles que Kv1.3b, un récepteur de la cortisone qui est impliqué dans le transport de K^+ dans les lymphocytes T, ou la protéine disulfide isomerase (PDI) qui est impliquée dans le stress oxydatif (Barnea et al., 2014). Dans cette revue, nous avons exposé les différents arguments qui mettent en évidence un potentiel intérêt thérapeutique du PIFs dans la prévention de la PE.

II- Discussion

Argument 1 : Le PIF exerce un rôle protecteur contre le stress oxydatif

Dans une étude publiée en 2011, Stamatkin et collaborateurs ont mis en évidence un effet protecteur du PIFs sur le développement d'embryons cultivés dans un milieu « toxique » induit par l'ajout de sérum de femmes présentant des échecs répétés de grossesse. L'étude des partenaires protéiques du PIF a permis d'identifier une interaction entre le PIFs et des protéines liées au contrôle du stress oxydatif telles que PDI ou liées au repliement des protéines telles que les heat shock protein (Barnea et al., 2014). Il est clairement établi que le développement d'une PE peut être associé à l'apparition d'un stress oxydatif provoqué par une ischémie placentaire (Chaiworapongsa et al., 2014; Jauniaux et al., 2000a). En ciblant des protéines impliquées i) dans la protection contre le stress oxydatif et ii) le mauvais repliement des protéines, le PIF pourrait protéger précocement de l'apparition de PE liées à une altération de la circulation placentaire.

Argument 2 : Le PIF favorise les interactions entre le conceptus et l'organisme maternel

Des travaux récents montrent que le PIFs régule l'expression de l'intégrine $\alpha 2\beta 3$ dans l'endomètre humain. Le PIFs favorise également la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires par les cellules stromales endométriales, tels que les interleukines IL8, IL1 β et IL6 (Barnea et al., 2012b). De plus, il a été montré, dans des cellules stromales humaines, que le PIFs induit une augmentation de l'expression de l'amphiréguline et de l'epiréguline, deux membres de la famille de l'epidermal growth factor (EGF), qui est connue pour favoriser le développement embryonnaire(Lee et al., 2009). Une étude génomique et protéomique a montré un effet du PIFs sur des gènes associés au contrôle de la prolifération, de l'apoptose

et de l'immunité des cellules endométriales (Paidas et al., 2010). Enfin, nous avons montré un effet pro-invasif du PIFs sur les CTEV (Moindjie et al., 2014). L'ensemble de ces observations suggèrent que le PIFs joue un rôle majeur dans l'implantation embryonnaire et dans les interactions entre le conceptus et l'endomètre maternel.

Argument 3 : Le PIF favorise l'immunotolérance

La capacité du système immunitaire maternel à ne pas manifester de réaction agressive vis-à-vis de l'embryon semi-allogénique est essentielle au bon déroulement de la grossesse. Il a été montré que le PIFs est un modulateur de l'activation des lymphocytes B et T (Barnea et al., 2012b). De plus, il a été démontré que le PIFs exerce son effet embryo-protecteur en diminuant la cytotoxicité des cellules natural killer (NK) (Roussev et al., 2013). Des études réalisées dans des modèles de maladies auto-immunes, de transplantations ou de dommages cérébraux ont démontré les propriétés immunoprotectives du PIFs (Azar et al., 2013; Mueller et al., 2014, 2015; Shainer et al., 2013; Weiss et al., 2011).

En résumé, l'ensemble de ces données issues d'expérimentations *in vitro* et *in vivo*, indiquent clairement un effet embryo-protecteur du PIFs. Celui-ci pourrait agir en prévenant le stress oxydatif, en régulant l'environnement inflammatoire et en favorisant la communication foëto-maternelle. Les mécanismes physiopathologiques de la PE, encore mal connus, semblent être liés, en partie, à un défaut de l'invasion trophoblastique. Ce dysfonctionnement placentaire induit un remodelage incomplet des artères utérines spiralées et conduit, *in fine*, à l'apparition d'un stress oxydatif placentaire.

Le premier essai clinique, chez l'Homme, visant à traiter des hépatites auto-immunes avec le PIFs a été récemment autorisé. Il est donc envisageable d'utiliser, dans un futur plus ou

moins proche, le PIFs en prophylaxie afin de prévenir des pathologies liées à la grossesse telles que la PE.

Troisième partie :

Discussion et

Perspectives

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux rôles du Facteur Préimplantatoire (PIF) dans le développement placentaire humain normal et pathologique. Nous avons montré que ce facteur est essentiellement exprimé dans les cellules trophoblastiques extravilleuses. Dans ces cellules, il exerce des effets pro-invasifs et anti-apoptotiques. Ces résultats, suggèrent que le PIF est un facteur favorable dans la mise en place d'un placenta fonctionnel notamment en régulant les processus d'invasion trophoblastique et de mort cellulaire. D'autre part, des dérégulations de l'invasion et de l'apoptose trophoblastiques ont été mises en évidence dans l'étiologie de certaines pathologies de la grossesse associées à des altérations de la placentation. Dans ce contexte, nous avons également montré que l'expression du PIF est diminuée dans des placentas issus de grossesses présentant une pré-éclampsie (PE) et/ou un retard de croissance intra-utérin (RCIU).

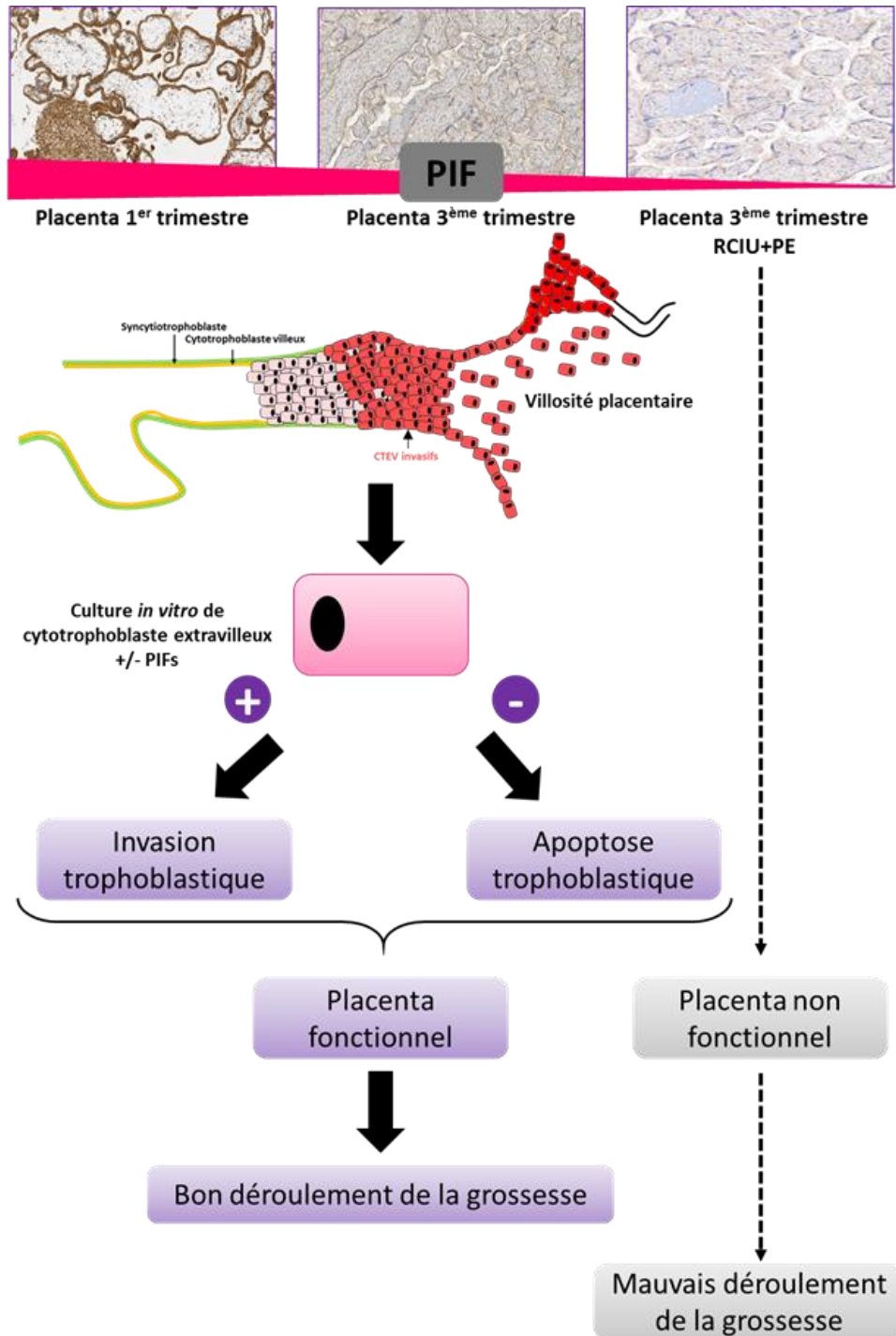


Figure 29: Schéma bilan des résultats.

I. Le PIF : un nouveau facteur présent à l'interface fœto-maternelle

Le PIF est un petit peptide découvert en 1994. Des approches menées *in vitro* ont d'abord montré que ce facteur est sécrété par l'embryon et exerce un effet favorable sur le

développement embryonnaire. De plus, ce facteur est présent dans la circulation maternelle au cours de la grossesse.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés, pour la première fois, aux rôles du PIF dans le placenta humain. Nous avons étudié, par immunohistochimie, l'expression du PIF dans le placenta humain au cours de la grossesse. Ainsi, nous avons montré que le PIF est **fortement exprimé dans les placentas de 1^{er} trimestre** et que cette expression diminue à partir de la 12^{ème} semaine de grossesse. Ces résultats confirment une étude précédente réalisée par Barnea et coll. En effet, ces auteurs ont montré, par immunoblot, une très forte diminution de l'expression du PIF entre le 1^{er} et le 3^{ème} trimestre de la grossesse (Barnea, 2007). Nous avons également pu montrer que le PIF est exprimé à la bordure des villosités choriales. L'immunomarquage du PIF autour du site d'implantation de l'embryon montre qu'il est plus particulièrement présent dans le cytoplasme des cellules trophoblastiques et de manière moindre, dans les cellules déciduales. Enfin, nous avons montré que **l'expression protéique du PIF est plus élevée dans les cytotrophoblastes extravilleux (CTEV)** par comparaison aux cytotrophoblastes villeux (CTV) issus de placentas de premier trimestre.

Lors de ce travail de caractérisation, nous nous sommes également intéressés à l'expression du PIF dans les tissus fœtaux humains. Nos expériences d'immunomarquage ont mis en évidence que le PIF est fortement exprimé dans les cellules macrophagiques et lymphocytaires présentes dans le pancréas, les poumons et le thymus. D'ailleurs, nous avons observé une expression importante du PIF dans les cellules de Hofbauer présentes dans l'axe mésenchymateux des villosités trophoblastiques. Les cellules de Hofbauer sont des cellules macrophagiques placentaires, d'origine fœtale. Elles sécrètent des facteurs angiogéniques et anti-inflammatoires qui participent à l'ancrage du placenta (Young et al., 2015; Seval et al.,

2007). La présence du PIF dans ces différents types cellulaires macrophagiques suggère que le PIF pourrait exercer un rôle immunomodulateur dans le placenta humain. Des études menées sur des modèles de maladies auto-immunes, de transplantations ou de dommages cérébraux ont démontré les propriétés immunoprotectives du PIFs *via* la régulation de nombreux mécanismes inflammatoires et immunitaires (Weiss et al., 2012; Azar et al., 2013; Shainer et al., 2013; Mueller et al., 2015).

En conclusion, la première partie de ce travail a permis de mettre en évidence, pour la première fois, la localisation précise et la forte expression protéique du PIF dans le placenta humain. Sa présence dans les cellules trophoblastiques et immunitaires de la villosité appuie l'hypothèse selon laquelle **le PIF pourrait être un facteur d'origine embryonnaire permettant la mise en place de la tolérance maternelle à l'interface foëto-maternelle et favorisant l'implantation embryonnaire.**

Il est intéressant de noter que nos expériences d'immunohistochimie ont révélé la présence de ce facteur dans le syncytiotrophoblaste. Par conséquent, nous souhaitons étudier l'effet, *in vitro*, du PIFs (dose-réponse et cinétique) sur la différenciation des CTV isolés à partir de placentas de 1er trimestre. Nous analyserons d'une part, la différenciation morphologique des CTV en étudiant l'expression des marqueurs de la fusion cellulaire (syncytine 2 et cadhérine E). D'autre part, nous étudierons la différenciation biochimique en mesurant les taux de l'hCG et de la leptine sécrétés par des CTV. Si des effets du PIFs sur la différenciation des CTV sont observés, nous étudierons plus particulièrement les voies de signalisation impliquées (PKA et PKC). Le syncytiotrophoblaste est responsable de la fonction endocrine du placenta. Nous pouvons émettre l'hypothèse que la présence de PIF retrouvée dans la circulation maternelle est issue du placenta qui prendrait le relais de la sécrétion

embryonnaire observée dès les premiers stades de la grossesse. Ainsi, le PIF pourrait être considéré comme un nouveau régulateur exerçant des effets autocrines sur la placentation au même titre que l'hCG, la leptine...

En outre, la présence du PIF dans les cytotrophoblastes non invasifs et dans le placenta de plusieurs espèces de mammifères, à placentation non hémochoriale, laisse supposer que ce facteur pourrait contrôler d'autres fonctions impliquées dans l'implantation embryonnaire. Dans ce contexte, nous avons étudié l'expression protéique du PIF dans des placentas de porc. Dans l'espèce porcine, la placentation est de type épithelio-choriale. Ce modèle de placentation est adapté à l'étude des phénomènes de reconnaissance et d'adhésion entre le fœtus et l'endomètre maternel (Mathew et al., 2016; Bazer et al., 2009). Nous avons entrepris ce travail de caractérisation de l'expression protéique du PIF sur des coupes de placentas, d'utérus et de trophoblastes porcins prélevés au cours de la phase précoce de la gestation. Nos premiers résultats indiquent que le PIF est fortement exprimé dans le trophoctoderme. L'analyse des coupes d'utérus non gravides semble également indiquer la présence de PIF dans l'endomètre indépendamment de la présence d'un embryon. Cette observation suggère que le PIF présente une origine embryonnaire mais également maternelle.

Notre analyse immunohistochimique de placentas humains de 1^{er} trimestre montre que le PIF est majoritairement présent dans les cytotrophoblastes extravilleux. Nous avons donc poursuivi ce travail en nous intéressant aux rôles du PIF sur deux fonctions clés de l'implantation embryonnaire, l'invasion et l'apoptose trophoblastiques.

II. Le PIF : un nouveau facteur régulateur de l'implantation

embryonnaire

Au cours de ce travail, nous avons montré que le PIF régule des processus clés de l'implantation embryonnaire. En effet, nous avons mis en évidence que le PIFs **stimule l'invasion des cytotrophoblastes extravilloux (CTEV) issus de placentas de 1^{er} trimestre**. L'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans l'effet pro-invasif du PIF sur les CTEV, nous a permis de montrer que **le PIF i) régule l'activité des métalloprotéases *via* la balance MMP-9/TIMP-1, ii) favorise l'expression des intégrines pro-invasives $\alpha v 1$ et αv et iii) active les voies de signalisation MAPK, PI3K et JAK-STAT**. Cet effet pro-invasif a été suggéré en 2010, dans une étude réalisée sur une lignée de cellules trophoblastiques immortalisées HTR-8/SVneo. Dans ce travail, les mécanismes moléculaires sous-jacents de l'effet pro-invasif du PIFs n'avaient pas été explorés. L'absence d'effet synergique avec l'EGF, un facteur pro-invasif, avait néanmoins suggéré que le PIF puisse exercer ses effets *via* les récepteurs et/ou les voies de signalisation de l'EGF (Duzyj et al., 2010).

Les mécanismes moléculaires expliquant cet effet pro-invasif du PIF dans les CTEV restent à préciser. En effet, l'invasion trophoblastique est un mécanisme complexe faisant intervenir différentes familles de molécules et différents types cellulaires. Nous avons donc réalisé une analyse génomique globale à partir de CTEV maintenus en culture en présence ou non de PIFs.

Notre analyse transcriptomique des gènes dérégulés par le PIF dans les CTEV a clairement montré que **le PIF contrôle l'expression d'ARN longs non codants, les lincRNA**. Plusieurs études récentes mettent en évidence l'implication des lincRNA dans la régulation de la

transcription de gènes cibles, du cycle cellulaire, de la différenciation cellulaire et de l'apoptose (Hu et al., 2012). Par exemple, une étude récente a montré que le lincRNA MALAT-1 régule la prolifération, l'apoptose, la migration et l'invasion trophoblastique (Chen et al., 2015). Par conséquent, il est possible que le PIF favorise l'invasion trophoblastique en régulant également l'expression d'ARN non codants tels que les lincRNA ou les mi-ARN. Afin de valider cette hypothèse, nous envisageons d'étudier le miRnome de CTEV cultivés en présence ou en absence de PIFs. A l'aide des outils d'analyses *in silico*, capables de prédire à la fois les cibles transcriptionnelles et les fonctions biologiques contrôlées par les mi-ARN, nous pourrions définir des mi-ARN d'intérêts. A partir de cette analyse, il serait possible d'effectuer une étude fonctionnelle en étudiant l'impact de la surexpression ou de l'inhibition de ces mi-ARN dans les effets du PIF sur l'invasion trophoblastique.

Le PIF pourrait également favoriser l'invasion trophoblastique en régulant les **interactions entre les CTEV et la MEC**. Nous avons effectivement montré que le PIFs régule l'expression des intégrines $\alpha 1$ et αv dans les CTEV. La fonction majeure de ces facteurs d'adhésion est d'assurer les contacts entre les cellules et la MEC. Des travaux récents ont démontré que le **PIFs interagit avec des protéines du cytosquelette**. Plus précisément, dans les cellules macrophagiques, le PIF se lie à la tropomoduline, une protéine exprimée à l'extrémité des filaments d'actine (Barnea et al., 2016). D'autre part, le PIF augmente l'expression des gènes codant pour la Down syndrome cell adhesion like 1 (DSCAML1), la connexine 45 ou encore la sorbin and SH3-domain-containing 2 (SORBS2) dans les cellules endométriales. Ces molécules régulent l'organisation du cytosquelette et participent à la formation de fibres de stress dans les complexes focaux (FAK) (Paidas et al., 2010). Ces données de la littérature laissent supposer que le PIF pourrait favoriser les capacités migratoires des CTEV en

modulant, d'une part, l'expression de molécules d'adhésion et, d'autre part, la réorganisation du cytosquelette des CTEV au cours de leur migration dans l'endomètre.

Par ailleurs, nos analyses bio-informatiques des gènes cibles du PIF ont également mis en évidence un effet du PIF sur l'**expression d'un grand nombre de récepteurs olfactifs (RO)**.

Les RO sont exprimés dans les spermatozoïdes, le cœur, les poumons, le cerveau, la peau ou le placenta, ce qui suggère que ces récepteurs possèdent des fonctions annexes voire complémentaires à l'olfaction (Ferrer et al., 2016). Plusieurs études ont effectivement établi une corrélation entre ces récepteurs et l'embryogenèse (Dreyer, 1998). D'autre part, il semble que les RO participent activement à la reconnaissance cellulaire et au guidage des cellules en migration. Par exemple, dans le placenta de rat, les RO sont présents dans les cellules trophoblastiques géantes. Ces cellules, qui se différencient à partir du CTEV, sont capables de migrer dans la décidue au cours de leur différenciation (Itakura et al., 2006). De plus, plusieurs études ont démontré que les RO sont surexprimés dans certains tissus cancéreux. En particulier, l'activation des RO semble favoriser le potentiel invasif et métastatique des cellules cancéreuses prostatiques (Sanz et al., 2014; Xu et al., 2000). L'ensemble de ces observations, laisse à supposer que le PIF pourrait exercer son effet pro-invasif sur les CTEV *via*, l'expression de RO spécifiques.

Finalement, il est important de rappeler que le processus d'invasion trophoblastique est contrôlé par deux partenaires à l'interface foëto-maternelle, le trophoblaste et l'endomètre maternel. Or, à ce jour, nos expérimentations se sont limitées à étudier les effets du PIFs sur les cellules trophoblastiques uniquement. Il a clairement été montré que l'endomètre agit comme un « biosenseur » de l'environnement à l'interface foëto-maternelle afin de réguler l'implantation embryonnaire (Brosens et al., 2014; Sandra et al., 2011). Par conséquent,

nous avons entrepris l'étude des fonctions du PIFs sur l'endomètre humain. Nos résultats préliminaires révèlent que le PIFs réduit la décidualisation des cellules stromales humaines isolées à partir de biopsies d'endomètres prélevés au cours de la fenêtre implantatoire. En effet, le PIFs diminue l'expression et la sécrétion de la prolactine et l'expression de l'IGFBP1 qui sont deux marqueurs de la décidualisation dans les cellules stromales endométriales (Gellersen and Brosens, 2014).

La mise en évidence des rôles du PIF sur les fonctions endométriales viendra compléter deux études réalisées par l'équipe du Dr Paidas. Ces travaux ont montré que dans les cellules stromales décidualisées, le PIFs régule des gènes impliqués dans le contrôle de l'immunité, de l'adhésion cellulaire et de l'apoptose. En conclusion, ces travaux suggèrent **un rôle paracrine du PIF sur l'endomètre maternel** (Barnea et al., 2012b; Paidas et al., 2010).

Au sein de notre laboratoire, nous tentons actuellement de **mettre au point un système de co-culture entre des cellules épithéliales endométriales et des explants placentaires de 1^{er} trimestre de grossesse**. Ce modèle, plus proche de la physiologie, nous permettra d'étudier le potentiel contrôle de l'invasion par l'endomètre en présence de PIFs. Pour cela, nous allons étudier l'effet du PIFs sur i) l'expression des marqueurs de la réceptivité utérine, ii) l'activité des MMP et TIMP libérées par les cellules stromales endométriales en culture et iii) suivre l'invasion en temps réel de CTEV sur une couche de cellules endométriales (time lapse).

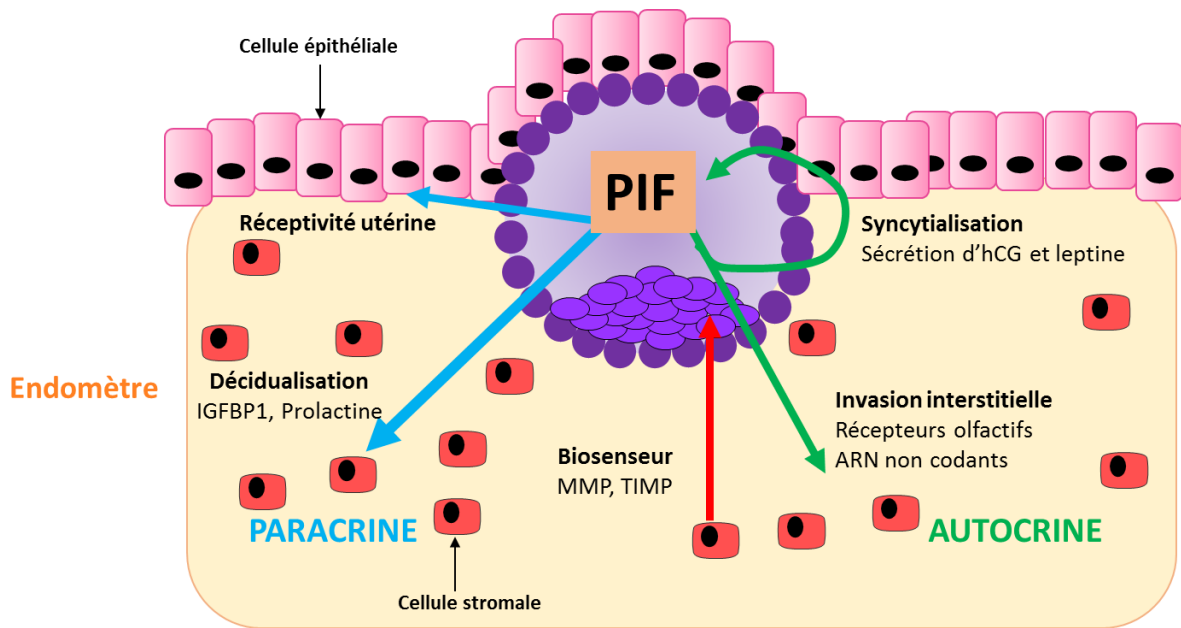


Figure 30: Perspectives d'études *in vitro*.

Afin de compléter l'étude des effets autocrines du PIF sur les cellules trophoblastiques nous envisageons d'étudier i) le rôle des récepteurs olfactifs activés par le PIF dans l'invasion trophoblastique et ii) les effets du PIF sur la différenciation du cytotrophoblaste villositaire. Afin d'étudier les effets paracrines du PIF sur l'endomètre sont prévus d'être étudiés i) les effets du PIF sur i) la décidualisation de l'endomètre, ii) la réceptivité utérine et iii) sur le contrôle de l'invasion par les cellules endométriales.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons également mis en évidence l'effet du PIF sur une seconde **fonction placentaire essentielle : l'apoptose trophoblastique**. Nous avons montré que le PIF exerce un effet protecteur sur l'apoptose dans les CTEV. Nous avons montré sur des modèles de CTEV et sur des cellules trophoblastiques immortalisées HTR-8/SVneo que le PIFs diminue l'activation de la protéine p53, *via* l'inhibition de la phosphorylation de p53 sur le résidu Serine 15. Nous avons également montré que le PIFs favorise l'expression de l'anti-oncogène Bcl2 et réprime l'expression des pro-oncogènes Bax et Bak. L'implication du PIF dans la régulation de l'apoptose a également été décrite par deux autres équipes. Plus précisément, il a été montré, dans des cellules neuronales, que le PIF exerce un effet neuroprotecteur en inhibant entre autre l'apoptose. Cet effet anti-apoptotique s'explique

par une réduction de la biogenèse du mi-ARN let-7 et par une stimulation de l'expression de Bcl2 (Mueller et al., 2015). De plus, une analyse transcriptomique, réalisée sur des cellules endométriales, a révélé que le PIFs inhibe l'expression de Bcl2 et stimule l'expression de MDM2 (mouse double minute 2 homologue). MDM2 est le principal antagoniste de p53. Ces résultats suggèrent ainsi un effet pro-apoptotique du PIF dans l'endomètre (Paidas et al., 2010). L'ensemble de ces données suggèrent que le PIF est **un régulateur de l'apoptose et que ses effets sont principalement médiés *via* l'anti-oncogène Bcl2**. Le PIFs exerce un effet anti-apoptotique dans les cellules trophoblastiques et l'effet inverse dans les cellules endométriales. Or, il est bien établi qu'une apoptose physiologique des cellules épithéliales endométriales est nécessaire à l'implantation embryonnaire. Cette mort cellulaire est provoquée par le trophoblaste lui-même qui exprime à sa surface le FasL tandis que l'endomètre exprime le récepteur de Fas (FasR) (Boeddeker and Hess, 2015).

L'apoptose physiologique des cytotrophoblastes extravilloux est peu documentée. Néanmoins, des études immunohistochimiques et *in vitro* ont démontré l'existence d'une apoptose physiologique des CTEV au cours de l'invasion trophoblastique (Murakoshi et al., 2003). Les auteurs suggèrent que cette apoptose pourrait être un mécanisme permettant de limiter spatialement l'invasion trophoblastique. D'autre part, des études réalisées sur des cellules cancéreuses ont également établi un lien direct entre l'apoptose et le potentiel invasif. Les MMP sont des enzymes décrites pour digérer la MEC et ainsi favoriser l'invasion cellulaire. Cependant, des données récentes montrent que les MMP clivent des protéines qui participent au processus apoptotique telles que les matrikines ou les pro-neurotrophines (Wells et al., 2015). **En conclusion, l'effet anti-apoptotique du PIFs dans les CTEV pourrait en partie expliquer l'effet pro-invasif de ce peptide dans ces cellules.**

Au cours de ce travail de thèse, nous avons montré qu'il existe une altération de l'expression placentaire de PIF chez des femmes présentant une PE plus ou moins associée à un RCIU. De plus, il est bien établi que ces pathologies sont associées à une invasion trophoblastique réduite et à un excès d'apoptose (Kadyrov et al., 2006). L'ensemble de ces observations suggèrent **une potentielle implication du PIF dans les pathologies de la grossesse associées à des altérations de la placentation.**

Récemment, une accumulation et une agrégation de protéines mal repliées ont été détectées dans les urines et dans les placentas de femmes présentant des pré-éclampsies sévères. Il a été montré que ces protéines mal repliées présentent une forte affinité pour le rouge Congo (congophilie) qui est un marqueur des dépôts amyloïdes. Parmi ces protéines se trouvent la transthyretin (TTR), le précurseur de la protéine amyloïde (APP), la SERPINA1 et le peptide amyloïde β ($A\beta$) (Buhimschi et al., 2014; Kalkunte et al., 2013). Plusieurs maladies dégénératives telles que les maladies d'Alzheimer, de Parkinson ou d'Huntington sont associées à des défauts du repliement et à l'agrégation délétère de protéines (Chaudhuri and Paul, 2006; Bucciantini et al., 2002). Par analogie entre les défauts de repliement de protéines, la maladie d'Alzheimer qui est induite par une accumulation d' $A\beta$ et la pré-éclampsie, l'équipe du Dr Sharma S. tente de mettre en évidence les mécanismes impliqués dans l'apparition de la PE. Les mécanismes susceptibles d'induire l'accumulation de TTR, d'APP et d' $A\beta$ dans les placentas de PE sévères sont, entre autres, un stress du réticulum endoplasmique (induit par l'hypoxie, l'ischémie et des cytokines pro-inflammatoires) et des altérations du fonctionnement des régulateurs de la protéostasie. Ces régulateurs sont essentiellement des protéines chaperonnes (HSP70, HSP90, chaperonine/HSP60), le système ubiquitine/protéasome et la machinerie de l'autophagie.

Or, il a clairement été montré que le PIF se lie aux protéines chaperonnes (HSP70 et HSP90) et régule ainsi le stress oxydatif. Une **altération de l'expression du PIF pourrait ainsi participer à la physiopathologie de la PE *via* son rôle dans le contrôle du repliement des protéines** (Barnea et al., 2015).

L'absence de la séquence codante du PIF est la limite principale des études portant sur ce facteur. En effet, invalider ou surexprimer le gène du PIF permettrait de mieux définir les mécanismes dans lesquels il est impliqué. Afin de pallier ce problème, une équipe a développé un vecteur de transfection synthétique permettant l'expression d'un PIF « étiqueté ». Cet outil devrait permettre, en attendant l'identification formelle de la séquence codante, de mieux définir les mécanismes moléculaires impliqués dans les effets du PIF, de localiser son ou ses récepteurs ainsi que ses partenaires *in vivo* par des approches de co-immunoprécipitation.

III. Le PIF : un nouveau biomarqueur de sélection des embryons en F.I.V et du bon déroulement de la grossesse ?

L'infertilité représente un problème majeur de santé publique. En France, près d'un couple sur six présente des problèmes de fertilité. Malgré les nombreux progrès techniques réalisés ces dernières années en assistance médicale à la procréation (AMP), les taux de succès n'excèdent pas les 25 %. Les échecs en fécondation *in vitro* (F.I.V) sont principalement dûs i) à une mauvaise réceptivité endométriale, ii) à un défaut de la qualité embryonnaire et iii) à un défaut de l'implantation embryonnaire (Pourret et al., 2016).

Aujourd'hui la sélection des embryons les plus aptes à s'implanter est réalisée uniquement sur des critères morphologiques (nombre, taille, forme des blastomères, cinétique de division, aspect du cytoplasme). La mise en évidence de biomarqueurs de la compétence embryonnaire permettrait d'améliorer les taux de succès en F.I.V.

C'est dans ce contexte que notre laboratoire s'est initialement intéressé au PIF. Ce facteur remplit les caractéristiques d'un potentiel biomarqueur non invasif de la sélection des embryons en F.I.V. En effet, il s'agit d'un facteur soluble, sécrété par les embryons viables qui favorise le développement embryonnaire (Stamatkin et al., 2011a, 2011b). Nous développons actuellement un test ELISA quantitatif qui permettra de doser le PIF dans des liquides biologiques et en particulier dans le surnageant de culture embryonnaire. L'objectif de ce travail est de montrer s'il existe une corrélation entre les taux de PIF sécrétés par les embryons en F.I.V et les taux d'implantation. Si tel est le cas, nous pourrions envisager d'utiliser ce dosage dans la pratique clinique en association avec l'observation morphologique afin de sélectionner les embryons les plus aptes à s'implanter. *In fine*, l'objectif serait d'améliorer les taux de succès en F.I.V et de généraliser le transfert mono-embryonnaire.

Ce dosage du PIF sécrété dans des liquides biologiques pourrait également être utilisé comme un biomarqueur de certaines pathologies de la grossesse. Cette perspective repose sur la mise en évidence d'une corrélation entre les concentrations circulantes de PIF et les grossesses évolutives chez le modèle bovin (Ramu et al., 2013). De plus, une des premières études menées sur le PIF semble montrer une disparition du PIF circulant chez des femmes sujettes à des fausses couches (Coulam et al., 1995). Dans le cadre de ce travail, nous avons développé des anticorps spécifiques dirigés contre le PIF et nous avons constitué des

sérothèques contenant des prélèvements de sérums maternels obtenus tout au long de grossesses normales et pathologiques. L'objectif du prochain travail sera, dans un premier temps d'étudier, par un dosage immunoenzymatique, la cinétique de sécrétion du PIF au cours d'une grossesse normale. Dans un second temps, nous comparerons cette cinétique avec celle obtenue au cours de grossesses pathologiques afin de déterminer si ce dosage présente un intérêt pour le diagnostic de ces pathologies.

En conclusion, l'ensemble de ce travail de thèse a permis de mettre en évidence un nouvel acteur du dialogue fœto-maternel. Nous avons montré que le PIF régule des fonctions placentaires essentielles et qu'il est probablement impliqué dans des pathologies de la grossesse. De plus, la potentielle fonction de biomarqueur du PIF est pleine de promesses dans l'amélioration de la prise en charge personnalisée des couples en AMP.

Bibliographie

Achache, H., and Revel, A. (2006). Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum. Reprod. Update* *12*, 731–746.

Aghababaei, M., Perdu, S., Irvine, K., and Beristain, A.G. (2014). A disintegrin and metalloproteinase 12 (ADAM12) localizes to invasive trophoblast, promotes cell invasion and directs column outgrowth in early placental development. *Mol. Hum. Reprod.* *20*, 235–249.

Alfaidy, N. (2016). Prokineticin1 and pregnancy. *Ann. Endocrinol.* *77*, 101–104.

Alsat, E., Guibourdenche, J., Couturier, A., and Evain-Brion, D. (1998). Physiological role of human placental growth hormone. *Mol. Cell. Endocrinol.* *140*, 121–127.

Anteby, E.Y., Greenfield, C., Natanson-Yaron, S., Goldman-Wohl, D., Hamani, Y., Khudyak, V., Ariel, I., and Yagel, S. (2004). Vascular endothelial growth factor, epidermal growth factor and fibroblast growth factor-4 and -10 stimulate trophoblast plasminogen activator system and metalloproteinase-9. *Mol. Hum. Reprod.* *10*, 229–235.

Anton, L., Olarerin-George, A.O., Schwartz, N., Srinivas, S., Bastek, J., Hogenesch, J.B., and Elovitz, M.A. (2013). miR-210 inhibits trophoblast invasion and is a serum biomarker for preeclampsia. *Am. J. Pathol.* *183*, 1437–1445.

Apparao, K.B., Murray, M.J., Fritz, M.A., Meyer, W.R., Chambers, A.F., Truong, P.R., and Lessey, B.A. (2001). Osteopontin and its receptor alphavbeta(3) integrin are coexpressed in the human endometrium during the menstrual cycle but regulated differentially. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *86*, 4991–5000.

Ashcroft, M., Kubbutat, M.H.G., and Vousden, K.H. (1999). Regulation of p53 Function and Stability by Phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 1751–1758.

Ashton, S.V., Whitley, G.S.J., Dash, P.R., Wareing, M., Crocker, I.P., Baker, P.N., and Cartwright, J.E. (2005). Uterine spiral artery remodeling involves endothelial apoptosis induced by extravillous trophoblasts through Fas/FasL interactions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *25*, 102–108.

Athanassiades, A., Hamilton, G.S., and Lala, P.K. (1998). Vascular endothelial growth factor stimulates proliferation but not migration or invasiveness in human extravillous trophoblast. *Biol. Reprod.* *59*, 643–654.

Aughsteeen, A.A., Abu-Umair, M.S., and Mahmoud, S.A. (2005). Biochemical analysis of serum pancreatic amylase and lipase enzymes in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Saudi Med. J.* *26*, 73–77.

Azar, Y., Shainer, R., Almogi-Hazan, O., Bringer, R., Compton, S.R., Paidas, M.J., Barnea, E.R., and Or, R. (2013). Preimplantation factor reduces graft-versus-host disease by regulating immune response and lowering oxidative stress (murine model). *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* *19*, 519–528.

Bach, J.F., Dormont, J., Dardenne, M., and Balner, H. (1969). In vitro rosette inhibition by antihuman antilymphocyte serum. Correlation with skin graft prolongation in subhuman primates. *Transplantation* 8, 265–280.

Barboux, S., Erwich, J.J.H.M., Favaron, P.O., Gil, S., Gallot, D., Golos, T.G., Gonzalez-Bulnes, A., Guibourdenche, J., Heazell, A.E.P., Jansson, T., et al. (2015). IFPA meeting 2014 workshop report: Animal models to study pregnancy pathologies; new approaches to study human placental exposure to xenobiotics; biomarkers of pregnancy pathologies; placental genetics and epigenetics; the placenta and stillbirth and fetal growth restriction. *Placenta* 36 *Suppl 1*, S5-10.

Barker, C.F., and Billingham, R.E. (1977). Immunologically privileged sites. *Adv. Immunol.* 25, 1–54.

Barnea, E.R. (2007). Applying embryo-derived immune tolerance to the treatment of immune disorders. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1110, 602–618.

Barnea, E.R., Lahijani, K.I., Roussev, R., Barnea, J.D., and Coulam, C.B. (1994). Use of lymphocyte platelet binding assay for detecting a preimplantation factor: a quantitative assay. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N* 1989 32, 133–138.

Barnea, E.R., Kirk, D., Ramu, S., Rivnay, B., Roussev, R., and Paidas, M.J. (2012a). Preimplantation Factor (PIF) orchestrates systemic antiinflammatory response by immune cells: effect on peripheral blood mononuclear cells. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 207, 313.e1-11.

Barnea, E.R., Kirk, D., and Paidas, M.J. (2012b). Preimplantation factor (PIF) promoting role in embryo implantation: increases endometrial Integrin- $\alpha 2\beta 3$, amphiregulin and epiregulin while reducing betacellulin expression via MAPK in decidua. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 10, 50.

Barnea, E.R., Lubman, D.M., Liu, Y.-H., Absalon-Medina, V., Hayrabydyan, S., Todorova, K., Gilbert, R.O., Guingab, J., and Barder, T.J. (2014). Insight into Preimplantation Factor (PIF*) Mechanism for Embryo Protection and Development: Target Oxidative Stress and Protein Misfolding (PDI and HSP) through Essential RIPK Binding Site. *PloS One* 9, e100263.

Barnea, E.R., Vialard, F., Moindjie, H., Ornaghi, S., Dieudonne, M.N., and Paidas, M.J. (2015). Preimplantation Factor (PIF*) endogenously prevents preeclampsia: Promotes trophoblast invasion and reduces oxidative stress. *J. Reprod. Immunol.*

Barnea, E.R., Hayrabydyan, S., Todorova, K., Almogi-Hazan, O., Or, R., Guingab, J., McElhinney, J., Fernandez, N., and Barder, T. (2016). Preimplantation factor (PIF*) regulates systemic immunity and targets protective regulatory and cytoskeleton proteins. *Immunobiology* 221, 778–793.

Bauer, S., Pollheimer, J., Hartmann, J., Husslein, P., Aplin, J.D., and Knöfler, 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.

- Bazer, F.W., Spencer, T.E., Johnson, G.A., Burghardt, R.C., and Wu, G. (2009). Comparative aspects of implantation. *Reprod. Camb. Engl.* *138*, 195–209.
- Bewick, M., Ogg, C.S., Parsons, V., Snowdon, S.A., and Manuel, L. (1972). Further assessment of rosette inhibition test in clinical organ transplantation. *Br. Med. J.* *3*, 491–494.
- Bhurke, A.S., Bagchi, I.C., and Bagchi, M.K. (2016). Progesterone-Regulated Endometrial Factors Controlling Implantation. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N* *1989* *75*, 237–245.
- Biadasiewicz, K., Sonderegger, S., Haslinger, P., Haider, S., Saleh, L., Fiala, C., Pollheimer, J., and Knöfler, M. (2011). Transcription factor AP-2 α promotes EGF-dependent invasion of human trophoblast. *Endocrinology* *152*, 1458–1469.
- Biadasiewicz, K., Fock, V., Dekan, S., Proestling, K., Velicky, P., Haider, S., Knöfler, M., Fröhlich, C., and Pollheimer, J. (2014). Extravillous trophoblast-associated ADAM12 exerts pro-invasive properties, including induction of integrin beta 1-mediated cellular spreading. *Biol. Reprod.* *90*, 101.
- Biegging, K.T., Mello, S.S., and Attardi, L.D. (2014). Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer* *14*, 359–370.
- Black, S., Kadyrov, M., Kaufmann, P., Ugele, B., Emans, N., and Huppertz, B. (2004). Syncytial fusion of human trophoblast depends on caspase 8. *Cell Death Differ.* *11*, 90–98.
- Boeddeker, S.J., and Hess, A.P. (2015). The role of apoptosis in human embryo implantation. *J. Reprod. Immunol.* *108*, 114–122.
- Boué, J.G., and Boué, A. (1976). Chromosomal anomalies in early spontaneous abortion. (Their consequences on early embryogenesis and in vitro growth of embryonic cells). *Curr. Top. Pathol. Ergeb. Pathol.* *62*, 193–208.
- Bouloumié, A., Drexler, H.C., Lafontan, M., and Busse, R. (1998). Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. *Circ. Res.* *83*, 1059–1066.
- Brett, K.E., Ferraro, Z.M., Yockell-Lelievre, J., Gruslin, A., and Adamo, K.B. (2014). Maternal-fetal nutrient transport in pregnancy pathologies: the role of the placenta. *Int. J. Mol. Sci.* *15*, 16153–16185.
- Brosens, J.J., Salker, M.S., Teklenburg, G., Nautiyal, J., Salter, S., Lucas, E.S., Steel, J.H., Christian, M., Chan, Y.-W., Boomsma, C.M., et al. (2014). Uterine selection of human embryos at implantation. *Sci. Rep.* *4*, 3894.
- Brown, G.T., and Murray, G.I. (2015). Current mechanistic insights into the roles of matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J. Pathol.* *237*, 273–281.
- Bucciantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J., Taddei, N., Ramponi, G., Dobson, C.M., and Stefani, M. (2002). Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature* *416*, 507–511.

- Buhimschi, I.A., Nayeri, U.A., Zhao, G., Shook, L.L., Pensalfini, A., Funai, E.F., Bernstein, I.M., Glabe, C.G., and Buhimschi, C.S. (2014). Protein misfolding, congophilia, oligomerization, and defective amyloid processing in preeclampsia. *Sci. Transl. Med.* *6*, 245ra92.
- Bukovsky, A., Cekanova, M., Caudle, M.R., Wimalasena, J., Foster, J.S., Henley, D.C., and Elder, R.F. (2003). Expression and localization of estrogen receptor-alpha protein in normal and abnormal term placentae and stimulation of trophoblast differentiation by estradiol. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* *1*, 13.
- Burton, G.J. (2009). Oxygen, the Janus gas; its effects on human placental development and function. *J. Anat.* *215*, 27–35.
- Burton, G.J., and Jauniaux, E. (2004). Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia. *J. Soc. Gynecol. Investig.* *11*, 342–352.
- Cameo, P., Bischof, P., and Calvo, J.C. (2003). Effect of leptin on progesterone, human chorionic gonadotropin, and interleukin-6 secretion by human term trophoblast cells in culture. *Biol. Reprod.* *68*, 472–477.
- Caniggia, I., Winter, J., Lye, S.J., and Post, M. (2000). Oxygen and placental development during the first trimester: implications for the pathophysiology of pre-eclampsia. *Placenta* *21 Suppl A*, S25-30.
- Carson, M.J., Doose, J.M., Melchior, B., Schmid, C.D., and Ploix, C.C. (2006). CNS immune privilege: hiding in plain sight. *Immunol. Rev.* *213*, 48–65.
- Chaiworapongsa, T., Chaemsaitong, P., Yeo, L., and Romero, R. (2014). Pre-eclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology. *Nat. Rev. Nephrol.* *10*, 466–480.
- Chappell, L.C., Duckworth, S., Seed, P.T., Griffin, M., Myers, J., Mackillop, L., Simpson, N., Waugh, J., Anumba, D., Kenny, L.C., et al. (2013). Diagnostic accuracy of placental growth factor in women with suspected preeclampsia: a prospective multicenter study. *Circulation* *128*, 2121–2131.
- Chaudhuri, T.K., and Paul, S. (2006). Protein-misfolding diseases and chaperone-based therapeutic approaches. *FEBS J.* *273*, 1331–1349.
- Chavarría, M.E., Lara-González, L., González-Gleason, A., Sojo, I., and Reyes, A. (2002). Maternal plasma cellular fibronectin concentrations in normal and preeclamptic pregnancies: a longitudinal study for early prediction of preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *187*, 595–601.
- Chehab, F.F., Lim, M.E., and Lu, R. (1996). Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat. Genet.* *12*, 318–320.
- Chelbi, S.T., Mondon, F., Jammes, H., Buffat, C., Mignot, T.-M., Tost, J., Busato, F., Gut, I., Rebourcet, R., Laissue, P., et al. (2007). Expressional and epigenetic alterations of placental

serine protease inhibitors: SERPINA3 is a potential marker of preeclampsia. *Hypertension* 49, 76–83.

Cheloufi, S., Dos Santos, C.O., Chong, M.M.W., and Hannon, G.J. (2010). A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature* 465, 584–589.

Chen, H., Meng, T., Liu, X., Sun, M., Tong, C., Liu, J., Wang, H., and Du, J. (2015). Long non-coding RNA MALAT-1 is downregulated in preeclampsia and regulates proliferation, apoptosis, migration and invasion of JEG-3 trophoblast cells. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 12718–12727.

Chesley, L.C. (1980). Hypertension in pregnancy: definitions, familial factor, and remote prognosis. *Kidney Int.* 18, 234–240.

Chipuk, J.E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M.J., and Green, D.R. (2010). The BCL-2 Family Reunion. *Mol. Cell* 37, 299–310.

Chou, C.-S., Zhu, H., MacCalman, C.D., and Leung, P.C.K. (2003). Regulatory effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) I and GnRH II on the levels of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in primary cultures of human extravillous cytotrophoblasts. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 4781–4790.

Chou, C.-S., Beristain, A.G., MacCalman, C.D., and Leung, P.C.K. (2004). Cellular localization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) I and GnRH II in first-trimester human placenta and decidua. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 1459–1466.

Christiansen, O.B., Nybo Andersen, A.-M., Bosch, E., Daya, S., Delves, P.J., Hviid, T.V., Kutteh, W.H., Laird, S.M., Li, T.-C., and van der Ven, K. (2005). Evidence-based investigations and treatments of recurrent pregnancy loss. *Fertil. Steril.* 83, 821–839.

Clevers, H., and Nusse, R. (2012). Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell* 149, 1192–1205.

Cnattingius, S., Reilly, M., Pawitan, Y., and Lichtenstein, P. (2004). Maternal and fetal genetic factors account for most of familial aggregation of preeclampsia: a population-based Swedish cohort study. *Am. J. Med. Genet. A.* 130A, 365–371.

Cole, L.A. (2010). Hyperglycosylated hCG, a review. *Placenta* 31, 653–664.

Conner, J.R., Smirnova, I.I., Moseman, A.P., and Poltorak, A. (2010). IRAK1BP1 inhibits inflammation by promoting nuclear translocation of NF-kappaB p50. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 11477–11482.

Cornillon, J., Campos, L., and Guyotat, D. (2003). [Focal adhesion kinase (FAK), a multifunctional protein]. *Médecine Sci. MS* 19, 743–752.

Cortelazzi, D., Corbetta, S., Ronzoni, S., Pelle, F., Marconi, A., Cozzi, V., Cetin, I., Cortelazzi, R., Beck-Peccoz, P., and Spada, A. (2007). Maternal and foetal resistin and adiponectin concentrations in normal and complicated pregnancies. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 66, 447–453.

- Costa, M.A. (2016). The endocrine function of human placenta: an overview. *Reprod. Biomed. Online* 32, 14–43.
- Coulam, C.B., and Roussev, R.G. (2003). Correlation of NK cell activation and inhibition markers with NK cytotoxicity among women experiencing immunologic implantation failure after in vitro fertilization and embryo transfer. *J. Assist. Reprod. Genet.* 20, 58–62.
- Coulam, C.B., Roussev, R.G., Thomason, E.J., and Barnea, E.R. (1995). Preimplantation factor (PIF) predicts subsequent pregnancy loss. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N* 1989 34, 88–92.
- Coya, R., Martul, P., Algorta, J., Aniel-Quiroga, M.A., Busturia, M.A., and Señarís, R. (2006). Effect of leptin on the regulation of placental hormone secretion in cultured human placental cells. *Gynecol. Endocrinol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Endocrinol.* 22, 620–626.
- Cullinan, E.B., Abbondanzo, S.J., Anderson, P.S., Pollard, J.W., Lessey, B.A., and Stewart, C.L. (1996). Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 3115–3120.
- Damsky, C.H., Librach, C., Lim, K.H., Fitzgerald, M.L., McMaster, M.T., Janatpour, M., Zhou, Y., Logan, S.K., and Fisher, S.J. (1994). Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. *Dev. Camb. Engl.* 120, 3657–3666.
- Das, S.K., Chakraborty, I., Paria, B.C., Wang, X.N., Plowman, G., and Dey, S.K. (1995). Amphiregulin is an implantation-specific and progesterone-regulated gene in the mouse uterus. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 9, 691–705.
- Di, W.L., Lachelin, G.C., McGarrigle, H.H., Thomas, N.S., and Becker, D.L. (2001). Oestriol and oestradiol increase cell to cell communication and connexin43 protein expression in human myometrium. *Mol. Hum. Reprod.* 7, 671–679.
- Di Simone, N., Di Nicuolo, F., Sanguinetti, M., Castellani, R., D’Asta, M., Caforio, L., and Caruso, A. (2006). Resistin regulates human choriocarcinoma cell invasive behaviour and endothelial cell angiogenic processes. *J. Endocrinol.* 189, 691–699.
- Di Simone, N., Di Nicuolo, F., Marzioni, D., Castellucci, M., Sanguinetti, M., D’Ippolito, S., and Caruso, A. (2009). Resistin modulates glucose uptake and glucose transporter-1 (GLUT-1) expression in trophoblast cells. *J. Cell. Mol. Med.* 13, 388–397.
- Diedrich, K., Fauser, B.C.J.M., Devroey, P., Griesinger, G., and Evian Annual Reproduction (EVAR) Workshop Group (2007). The role of the endometrium and embryo in human implantation. *Hum. Reprod. Update* 13, 365–377.
- DiFederico, E., Genbacev, O., and Fisher, S.J. (1999). Preeclampsia is associated with widespread apoptosis of placental cytotrophoblasts within the uterine wall. *Am. J. Pathol.* 155, 293–301.
- van Dijk, M., Mulders, J., Poutsma, A., Könst, A.A.M., Lachmeijer, A.M.A., Dekker, G.A., Blankenstein, M.A., and Oudejans, C.B.M. (2005). Maternal segregation of the Dutch

preeclampsia locus at 10q22 with a new member of the winged helix gene family. *Nat. Genet.* *37*, 514–519.

van Dijk, M., van Bezu, J., van Abel, D., Dunk, C., Blankenstein, M.A., Oudejans, C.B.M., and Lye, S.J. (2010). The STOX1 genotype associated with pre-eclampsia leads to a reduction of trophoblast invasion by alpha-T-catenin upregulation. *Hum. Mol. Genet.* *19*, 2658–2667.

Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Butel, J.S., and Bradley, A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* *356*, 215–221.

Doridot, L., Passet, B., Méhats, C., Rigourd, V., Barbaux, S., Ducat, A., Mondon, F., Vilotte, M., Castille, J., Breuiller-Fouché, M., et al. (2013). Preeclampsia-like symptoms induced in mice by fetoplacental expression of STOX1 are reversed by aspirin treatment. *Hypertension* *61*, 662–668.

Doridot, L., Châtre, L., Ducat, A., Vilotte, J.-L., Lombès, A., Méhats, C., Barbaux, S., Calicchio, R., Ricchetti, M., and Vaiman, D. (2014). Nitroso-redox balance and mitochondrial homeostasis are regulated by STOX1, a pre-eclampsia-associated gene. *Antioxid. Redox Signal.* *21*, 819–834.

Dos Santos, E., Serazin, V., Morvan, C., Torre, A., Wainer, R., de Mazancourt, P., and Dieudonné, M.-N. (2012). Adiponectin and leptin systems in human endometrium during window of implantation. *Fertil. Steril.* *97*, 771–778.e1.

Dreyer, W.J. (1998). The area code hypothesis revisited: olfactory receptors and other related transmembrane receptors may function as the last digits in a cell surface code for assembling embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 9072–9077.

Ducat, A., Doridot, L., Calicchio, R., Méhats, C., Vilotte, J.-L., Castille, J., Barbaux, S., Couderc, B., Jacques, S., Letourneur, F., et al. (2016). Endothelial cell dysfunction and cardiac hypertrophy in the STOX1 model of preeclampsia. *Sci. Rep.* *6*, 19196.

Duckitt, K., and Harrington, D. (2005). Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ* *330*, 565.

Duckworth, S., Griffin, M., Seed, P.T., North, R., Myers, J., Mackillop, L., Simpson, N., Waugh, J., Anumba, D., Kenny, L.C., et al. (2016). Diagnostic Biomarkers in Women With Suspected Preeclampsia in a Prospective Multicenter Study. *Obstet. Gynecol.*

Dunn, C.L., Kelly, R.W., and Critchley, H.O.D. (2003). Decidualization of the human endometrial stromal cell: an enigmatic transformation. *Reprod. Biomed. Online* *7*, 151–161.

Dupressoir, A., Vernochet, C., Bawa, O., Harper, F., Pierron, G., Opolon, P., and Heidmann, T. (2009). Syncytin-A knockout mice demonstrate the critical role in placentation of a fusogenic, endogenous retrovirus-derived, envelope gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 12127–12132.

- Dupressoir, A., Vernochet, C., Harper, F., Guégan, J., Dessen, P., Pierron, G., and Heidmann, T. (2011). A pair of co-opted retroviral envelope syncytin genes is required for formation of the two-layered murine placental syncytiotrophoblast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, E1164-1173.
- Duzyj, C.M., Barnea, E.R., Li, M., Huang, S.J., Krikun, G., and Paidas, M.J. (2010). Preimplantation factor promotes first trimester trophoblast invasion. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *203*, 402.e1-4.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* *35*, 495–516.
- Eta, E., Ambrus, G., and Rao, C.V. (1994). Direct regulation of human myometrial contractions by human chorionic gonadotropin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *79*, 1582–1586.
- Evans, J. (2016). Hyperglycosylated hCG: a Unique Human Implantation and Invasion Factor. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N 1989* *75*, 333–340.
- Ferrer, I., Garcia-Esparcia, P., Carmona, M., Carro, E., Aronica, E., Kovacs, G.G., Grison, A., and Gustincich, S. (2016). Olfactory Receptors in Non-Chemosensory Organs: The Nervous System in Health and Disease. *Front. Aging Neurosci.* *8*, 163.
- Fitzgerald, J.S., Busch, S., Wengenmayer, T., Foerster, K., de la Motte, T., Poehlmann, T.G., and Markert, U.R. (2005). Signal transduction in trophoblast invasion. *Chem. Immunol. Allergy* *88*, 181–199.
- Fitzgerald, J.S., Germeyer, A., Huppertz, B., Jeschke, U., Knöfler, M., Moser, G., Scholz, C., Sonderegger, S., Toth, B., and Markert, U.R. (2010). Governing the invasive trophoblast: current aspects on intra- and extracellular regulation. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N 1989* *63*, 492–505.
- Francis, V.A., Abera, A.B., Matjila, M., Millar, R.P., and Katz, A.A. (2014). Kisspeptin regulation of genes involved in cell invasion and angiogenesis in first trimester human trophoblast cells. *PLoS One* *9*, e99680.
- Frendo, J.-L., Olivier, D., Cheynet, V., Blond, J.-L., Bouton, O., Vidaud, M., Rabreau, M., Evain-Brion, D., and Mallet, F. (2003). Direct involvement of HERV-W Env glycoprotein in human trophoblast cell fusion and differentiation. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 3566–3574.
- Fryns, J.P., and Van Buggenhout, G. (1998). Structural chromosome rearrangements in couples with recurrent fetal wastage. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* *81*, 171–176.
- Gallot, V., Nedellec, S., Capmas, P., Legendre, G., Lejeune-Saada, V., Subtil, D., Nizard, J., Levêque, J., Deffieux, X., Hervé, B., et al. (2014). [Early recurrent miscarriage: Evaluation and management]. *J. Gynécologie Obstétrique Biol. Reprod.* *43*, 812–841.
- Gambino, Y.P., Maymó, J.L., Pérez-Pérez, A., Dueñas, J.L., Sánchez-Margalet, V., Calvo, J.C., and Varone, C.L. (2010). 17Beta-estradiol enhances leptin expression in human placental cells through genomic and nongenomic actions. *Biol. Reprod.* *83*, 42–51.

- Gellersen, B., and Brosens, J.J. (2014). Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. *Endocr. Rev.* 35, 851–905.
- Genbacev, O., Zhou, Y., Ludlow, J.W., and Fisher, S.J. (1997). Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science* 277, 1669–1672.
- Getsios, S., and MacCalman, C.D. (2003). Cadherin-11 modulates the terminal differentiation and fusion of human trophoblastic cells in vitro. *Dev. Biol.* 257, 41–54.
- Ghulmiyyah, L., and Sibai, B. (2012). Maternal mortality from preeclampsia/eclampsia. *Semin. Perinatol.* 36, 56–59.
- Giudice, L.C. (1999). Potential biochemical markers of uterine receptivity. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 14 Suppl 2, 3–16.
- Goldman, S., Lovett, D.H., and Shalev, E. (2009). Mechanisms of matrix metalloproteinase-2 (mmp-2) transcriptional repression by progesterone in jar choriocarcinoma cells. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 7, 41.
- Goodwin, T.M. (1999). A role for estriol in human labor, term and preterm. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 180, S208-213.
- Graham, C.H., and Lala, P.K. (1991). Mechanism of control of trophoblast invasion in situ. *J. Cell. Physiol.* 148, 228–234.
- Graham, C.H., and McCrae, K.R. (1996). Altered expression of gelatinase and surface-associated plasminogen activator activity by trophoblast cells isolated from placentas of preeclamptic patients. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 175, 555–562.
- Grosfeld, A., Andre, J., Hauguel-De Mouzon, S., Berra, E., Pouyssegur, J., and Guerre-Millo, M. (2002). Hypoxia-inducible factor 1 transactivates the human leptin gene promoter. *J. Biol. Chem.* 277, 42953–42957.
- Gross, S.J. (1997). Intrauterine growth restriction: a genetic perspective. *Clin. Obstet. Gynecol.* 40, 730–739.
- Guo, Y., Lee, C.-L., So, K.-H., Gao, J., Yeung, W.S.B., Yao, Y., and Lee, K.-F. (2013). Soluble human leukocyte antigen-g5 activates extracellular signal-regulated protein kinase signaling and stimulates trophoblast invasion. *PLoS One* 8, e76023.
- Gupta, S.K., Malhotra, S.S., Malik, A., Verma, S., and Chaudhary, P. (2016). Cell Signaling Pathways Involved During Invasion and Syncytialization of Trophoblast Cells. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N* 1989 75, 361–371.
- Halasz, M., and Szekeres-Bartho, J. (2013). The role of progesterone in implantation and trophoblast invasion. *J. Reprod. Immunol.* 97, 43–50.

- Halasz, M., Polgar, B., Berta, G., Czimbalek, L., and Szekeres-Bartho, J. (2013). Progesterone-induced blocking factor differentially regulates trophoblast and tumor invasion by altering matrix metalloproteinase activity. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *70*, 4617–4630.
- Hands Schuh, K., Guibourdenche, J., Tsatsaris, V., Guesnon, M., Laurendeau, I., Evain-Brion, D., and Fournier, T. (2007). Human chorionic gonadotropin expression in human trophoblasts from early placenta: comparative study between villous and extravillous trophoblastic cells. *Placenta* *28*, 175–184.
- Hands Schuh, K., Guibourdenche, J., Cocquebert, M., Tsatsaris, V., Vidaud, M., Evain-Brion, D., and Fournier, T. (2009). Expression and regulation by PPARgamma of hCG alpha- and beta-subunits: comparison between villous and invasive extravillous trophoblastic cells. *Placenta* *30*, 1016–1022.
- Handwerger, S., and Freemark, M. (2000). The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab. JPEM* *13*, 343–356.
- Harada, T., Kaponis, A., Iwabe, T., Taniguchi, F., Makrydimas, G., Sofikitis, N., Paschopoulos, M., Paraskevaidis, E., and Terakawa, N. (2004). Apoptosis in human endometrium and endometriosis. *Hum. Reprod. Update* *10*, 29–38.
- Harris, L.K., Jones, C.J.P., and Aplin, J.D. (2009). Adhesion molecules in human trophoblast - a review. II. extravillous trophoblast. *Placenta* *30*, 299–304.
- Hayashi, M., Sakata, M., Takeda, T., Yamamoto, T., Okamoto, Y., Sawada, K., Kimura, A., Minekawa, R., Tahara, M., Tasaka, K., et al. (2004). Induction of glucose transporter 1 expression through hypoxia-inducible factor 1alpha under hypoxic conditions in trophoblast-derived cells. *J. Endocrinol.* *183*, 145–154.
- Hayrabyan, S.B., Todorova, K.O., and Barnea, E.R. (2014). Structural design-based preimplantation factor (PIF*) fusion peptide synthetic DNA cloning and eukaryote expression aimed for functional proteomic studies and possible chronic immune disorders therapy. *J. Reprod. Immunol.* *101*, 60.
- Heazell, A.E.P., and Crocker, I.P. (2008). Live and let die - regulation of villous trophoblast apoptosis in normal and abnormal pregnancies. *Placenta* *29*, 772–783.
- Heazell, A.E.P., Sharp, A.N., Baker, P.N., and Crocker, I.P. (2011). Intra-uterine growth restriction is associated with increased apoptosis and altered expression of proteins in the p53 pathway in villous trophoblast. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* *16*, 135–144.
- Heinonen, S., Taipale, P., and Saarikoski, S. (2001). Weights of placentae from small-for-gestational age infants revisited. *Placenta* *22*, 399–404.
- Hendrix, N., and Berghella, V. (2008). Non-placental causes of intrauterine growth restriction. *Semin. Perinatol.* *32*, 161–165.

- Henson, M.C., Swan, K.F., and O'Neil, J.S. (1998). Expression of placental leptin and leptin receptor transcripts in early pregnancy and at term. *Obstet. Gynecol.* *92*, 1020–1028.
- Hiden, U., Bilban, M., Knöfler, M., and Desoye, G. (2007). Kisspeptins and the placenta: regulation of trophoblast invasion. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* *8*, 31–39.
- Highet, A.R., Khoda, S.M., Buckberry, S., Leemaqz, S., Bianco-Miotto, T., Harrington, E., Ricciardelli, C., and Roberts, C.T. (2015). Hypoxia induced HIF-1/HIF-2 activity alters trophoblast transcriptional regulation and promotes invasion. *Eur. J. Cell Biol.* *94*, 589–602.
- Hill, M., Pašková, A., Kančeva, R., Velíková, M., Kubátová, J., Kancheva, L., Adamcová, K., Mikešová, M., Žižka, Z., Koucký, M., et al. (2014). Steroid profiling in pregnancy: a focus on the human fetus. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *139*, 201–222.
- Hoffmann, P., Saoudi, Y., Benharouga, M., Graham, C.H., Schaal, J.-P., Mazouni, C., Feige, J.-J., and Alfaidy, N. (2009). Role of EG-VEGF in human placentation: Physiological and pathological implications. *J. Cell. Mol. Med.* *13*, 2224–2235.
- Hu, W., Alvarez-Dominguez, J.R., and Lodish, H.F. (2012). Regulation of mammalian cell differentiation by long non-coding RNAs. *EMBO Rep.* *13*, 971–983.
- Huang, H.Y., Wen, Y., Kruessel, J.S., Raga, F., Soong, Y.K., and Polan, M.L. (2001). Interleukin (IL)-1beta regulation of IL-1beta and IL-1 receptor antagonist expression in cultured human endometrial stromal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *86*, 1387–1393.
- Huppertz, B., Kadyrov, M., and Kingdom, J.C.P. (2006). Apoptosis and its role in the trophoblast. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *195*, 29–39.
- Huppertz, B., Weiss, G., and Moser, G. (2014). Trophoblast invasion and oxygenation of the placenta: measurements versus presumptions. *J. Reprod. Immunol.* *101–102*, 74–79.
- Hwang, J.H., Park, M.I., Hwang, Y.Y., Yoo, H.J., and Mardon, H.J. (2002). The characteristics of integrins expression in decidualized human endometrial stromal cell induced by 8-Br-cAMP in vitro. *Exp. Mol. Med.* *34*, 194–200.
- Iglesias-Platas, I., Monk, D., Jebbink, J., Buimer, M., Boer, K., van der Post, J., Hills, F., Apostolidou, S., Ris-Stalpers, C., Stanier, P., et al. (2007). STOX1 is not imprinted and is not likely to be involved in preeclampsia. *Nat. Genet.* *39*, 279–280–281.
- Ihnatovych, I., Hu, W., Martin, J.L., Fazleabas, A.T., de Lanerolle, P., and Strakova, Z. (2007). Increased phosphorylation of myosin light chain prevents in vitro decidualization. *Endocrinology* *148*, 3176–3184.
- Isaka, K., Usuda, S., Ito, H., Sagawa, Y., Nakamura, H., Nishi, H., Suzuki, Y., Li, Y.F., and Takayama, M. (2003). Expression and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in human trophoblasts. *Placenta* *24*, 53–64.

- Islami, D., Bischof, P., and Chardonnens, D. (2003). Possible interactions between leptin, gonadotrophin-releasing hormone (GnRH-I and II) and human chorionic gonadotrophin (hCG). *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* *110*, 169–175.
- Itakura, S., Ohno, K., Ueki, T., Sato, K., and Kanayama, N. (2006). Expression of Golf in the rat placenta: Possible implication in olfactory receptor transduction. *Placenta* *27*, 103–108.
- Janatpour, M.J., McMaster, M.T., Genbacev, O., Zhou, Y., Dong, J., Cross, J.C., Israel, M.A., and Fisher, S.J. (2000). Id-2 regulates critical aspects of human cytotrophoblast differentiation, invasion and migration. *Dev. Camb. Engl.* *127*, 549–558.
- Jauniaux, E., Watson, A.L., Hempstock, J., Bao, Y.-P., Skepper, J.N., and Burton, G.J. (2000a). Onset of Maternal Arterial Blood Flow and Placental Oxidative Stress. *Am. J. Pathol.* *157*, 2111–2122.
- Jauniaux, E., Watson, A.L., Hempstock, J., Bao, Y.P., Skepper, J.N., and Burton, G.J. (2000b). Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. *Am. J. Pathol.* *157*, 2111–2122.
- Jovanović, M., and Vićovac, L. (2009). Interleukin-6 stimulates cell migration, invasion and integrin expression in HTR-8/SVneo cell line. *Placenta* *30*, 320–328.
- Jovanović, M., Stefanoska, I., Radojčić, L., and Vićovac, L. (2010). Interleukin-8 (CXCL8) stimulates trophoblast cell migration and invasion by increasing levels of matrix metalloproteinase (MMP)2 and MMP9 and integrins alpha5 and beta1. *Reprod. Camb. Engl.* *139*, 789–798.
- Kabir-Salmani, M., Shiokawa, S., Akimoto, Y., Sakai, K., Nagamatsu, S., Sakai, K., Nakamura, Y., Lotfi, A., Kawakami, H., and Iwashita, M. (2003). α / β 3 Integrin Signaling Pathway Is Involved in Insulin-Like Growth Factor I-Stimulated Human Extravillous Trophoblast Cell Migration. *Endocrinology* *144*, 1620–1630.
- Kadyrov, M., Kingdom, J.C.P., and Huppertz, B. (2006). Divergent trophoblast invasion and apoptosis in placental bed spiral arteries from pregnancies complicated by maternal anemia and early-onset preeclampsia/intrauterine growth restriction. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *194*, 557–563.
- Kalkunte, S.S., Neubeck, S., Norris, W.E., Cheng, S.-B., Kostadinov, S., Vu Hoang, D., Ahmed, A., von Eggeling, F., Shaikh, Z., Padbury, J., et al. (2013). Transthyretin is dysregulated in preeclampsia, and its native form prevents the onset of disease in a preclinical mouse model. *Am. J. Pathol.* *183*, 1425–1436.
- Kamihara, J., Rana, H.Q., and Garber, J.E. (2014). Germline TP53 mutations and the changing landscape of Li-Fraumeni syndrome. *Hum. Mutat.* *35*, 654–662.
- Kaufmann, P., Black, S., and Huppertz, B. (2003). Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol. Reprod.* *69*, 1–7.

- Khokha, R., Murthy, A., and Weiss, A. (2013). Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 649–665.
- Kivinen, K., Peterson, H., Hiltunen, L., Laivuori, H., Heino, S., Tiala, I., Knuutila, S., Rasi, V., and Kere, J. (2007). Evaluation of STOX1 as a preeclampsia candidate gene in a population-wide sample. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* *15*, 494–497.
- Knofler, M. (2010). Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion. *Int. J. Dev. Biol.* *54*, 269–280.
- Knöfler, M., and Pollheimer, J. (2013). Human placental trophoblast invasion and differentiation: a particular focus on Wnt signaling. *Front. Genet.* *4*, 190.
- Kokkinos, M.I., Murthi, P., Wafai, R., Thompson, E.W., and Newgreen, D.F. (2010). Cadherins in the human placenta--epithelial-mesenchymal transition (EMT) and placental development. *Placenta* *31*, 747–755.
- Kyriakis, J.M., and Avruch, J. (2012). Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiol. Rev.* *92*, 689–737.
- Lacroix, M.-C., Guibourdenche, J., Fournier, T., Laurendeau, I., Igout, A., Goffin, V., Pantel, J., Tsatsaris, V., and Evain-Brion, D. (2005). Stimulation of human trophoblast invasion by placental growth hormone. *Endocrinology* *146*, 2434–2444.
- Lager, S., and Powell, T.L. (2012). Regulation of Nutrient Transport across the Placenta. *J. Pregnancy* *2012*.
- Lala, P.K., and Nandi, P. (2016). Mechanisms of trophoblast migration, endometrial angiogenesis in preeclampsia: The role of decorin. *Cell Adhes. Migr.* *10*, 111–125.
- Lash, G.E., Otun, H.A., Innes, B.A., Bulmer, J.N., Searle, R.F., and Robson, S.C. (2005). Inhibition of trophoblast cell invasion by TGFB1, 2, and 3 is associated with a decrease in active proteases. *Biol. Reprod.* *73*, 374–381.
- Le Bouteiller, P., and Tabiasco, J. (2006). Killers become builders during pregnancy. *Nat. Med.* *12*, 991–992.
- Le Bouteiller, P., Pizzato, N., Barakonyi, A., and Solier, C. (2003). HLA-G, pre-eclampsia, immunity and vascular events. *J. Reprod. Immunol.* *59*, 219–234.
- Lecarpentier, E., Fournier, T., Guibourdenche, J., and Tsatsaris, V. (2016). [Pathophysiology of preeclampsia]. *Presse Medicale Paris Fr.* 1983.
- Lédée, N., Petitbarat, M., Rahmati, M., Dubanchet, S., Chaouat, G., Sandra, O., Perrier-d'Hauterive, S., Munaut, C., and Foidart, J.M. (2011). New pre-conception immune biomarkers for clinical practice: interleukin-18, interleukin-15 and TWEAK on the endometrial side, G-CSF on the follicular side. *J. Reprod. Immunol.* *88*, 118–123.

- Lédée, N., Gridelet, V., Ravet, S., Jouan, C., Gaspard, O., Wenders, F., Thonon, F., Hincourt, N., Dubois, M., Foidart, J.M., et al. (2013). Impact of follicular G-CSF quantification on subsequent embryo transfer decisions: a proof of concept study. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *28*, 406–413.
- Lédée, N., Petitbarat, M., Chevrier, L., Vitoux, D., Vezmar, K., Rahmati, M., Dubanchet, S., Gahéry, H., Bensussan, A., and Chaouat, G. (2016). The Uterine Immune Profile May Help Women With Repeated Unexplained Embryo Implantation Failure After In Vitro Fertilization. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N* *1989* *75*, 388–401.
- Lee, C.-L., Chiu, P.C.N., Hautala, L., Salo, T., Yeung, W.S.B., Stenman, U.-H., and Koistinen, H. (2013). Human chorionic gonadotropin and its free β -subunit stimulate trophoblast invasion independent of LH/hCG receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* *375*, 43–52.
- Lee, J.H., Lee, E., Biswas, D., Jeung, C.S., Lee, G.S., Hyun, S.H., and Jeung, E.B. (2009). Amphiregulin promotes the proliferation of trophoblast cells during preimplantation development of porcine embryos. *Theriogenology* *72*, 1023–1031.
- Lehmann, S.M., Krüger, C., Park, B., Derkow, K., Rosenberger, K., Baumgart, J., Trimbuch, T., Eom, G., Hinz, M., Kaul, D., et al. (2012). An unconventional role for miRNA: let-7 activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration. *Nat. Neurosci.* *15*, 827–835.
- Lejeune, V. (2010). [Recurrent spontaneous miscarriage: etiology, and management of subsequent pregnancies]. *J. Gynécologie Obstétrique Biol. Reprod.* *39*, F11-16.
- Lessey, B.A. (2000). The role of the endometrium during embryo implantation. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *15 Suppl 6*, 39–50.
- Lessey, B.A. (2002). Adhesion molecules and implantation. *J. Reprod. Immunol.* *55*, 101–112.
- Liang, C.-Y., Wang, L.-J., Chen, C.-P., Chen, L.-F., Chen, Y.-H., and Chen, H. (2010). GCM1 regulation of the expression of syncytin 2 and its cognate receptor MFSD2A in human placenta. *Biol. Reprod.* *83*, 387–395.
- Librach, C.L., Werb, Z., Fitzgerald, M.L., Chiu, K., Corwin, N.M., Esteves, R.A., Grobelny, D., Galardy, R., Damsky, C.H., and Fisher, S.J. (1991). 92-kD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. *J. Cell Biol.* *113*, 437–449.
- Liu, C., Zhou, Y., and Zhang, Z. (2012). MiR-210: an important player in the pathogenesis of preeclampsia? *J. Cell. Mol. Med.* *16*, 943–944.
- Liu, J., Maccalman, C.D., Wang, Y., and Leung, P.C.K. (2009). Promotion of human trophoblasts invasion by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) I and GnRH II via distinct signaling pathways. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *23*, 1014–1021.
- Lucas, E.S., Dyer, N.P., Murakami, K., Lee, Y.H., Chan, Y.-W., Grimaldi, G., Muter, J., Brighton, P.J., Moore, J.D., Patel, G., et al. (2016). Loss of Endometrial Plasticity in Recurrent Pregnancy Loss. *Stem Cells Dayt. Ohio* *34*, 346–356.

- Luque, A., Farwati, A., Crovetto, F., Crispi, F., Figueras, F., Gratacós, E., and Aran, J.M. (2014). Usefulness of circulating microRNAs for the prediction of early preeclampsia at first-trimester of pregnancy. *Sci. Rep.* *4*, 4882.
- Magariños, M.P., Sánchez-Margalet, V., Kotler, M., Calvo, J.C., and Varone, C.L. (2007). Leptin promotes cell proliferation and survival of trophoblastic cells. *Biol. Reprod.* *76*, 203–210.
- Mangeny, M., Renard, M., Schlecht-Louf, G., Bouallaga, I., Heidmann, O., Letzelter, C., Richaud, A., Ducos, B., and Heidmann, T. (2007). Placental syncytins: Genetic disjunction between the fusogenic and immunosuppressive activity of retroviral envelope proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 20534–20539.
- Martínez-Hernández, M.G., Baiza-Gutman, L.A., Castillo-Trápala, A., and Armant, D.R. (2011). Regulation of proteinases during mouse peri-implantation development: urokinase-type plasminogen activator expression and cross talk with matrix metalloproteinase 9. *Reprod. Camb. Engl.* *141*, 227–239.
- Mathew, D.J., Lucy, M.C., and Geisert, R. (2016). Interleukins, interferons, and establishment of pregnancy in pigs. *Reprod. Camb. Engl.* *151*, R111-122.
- Mayhew, T.M. (2001). Villous trophoblast of human placenta: a coherent view of its turnover, repair and contributions to villous development and maturation. *Histol. Histopathol.* *16*, 1213–1224.
- Maynard, S.E., Min, J.-Y., Merchan, J., Lim, K.-H., Li, J., Mondal, S., Libermann, T.A., Morgan, J.P., Sellke, F.W., Stillman, I.E., et al. (2003). Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J. Clin. Invest.* *111*, 649–658.
- McCormick, J., Whitley, G.S.J., Le Bouteiller, P., and Cartwright, J.E. (2009). Soluble HLA-G regulates motility and invasion of the trophoblast-derived cell line SGHPL-4. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *24*, 1339–1345.
- McMaster, M.T., Librach, C.L., Zhou, Y., Lim, K.H., Janatpour, M.J., DeMars, R., Kovats, S., Damsky, C., and Fisher, S.J. (1995). Human placental HLA-G expression is restricted to differentiated cytotrophoblasts. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *154*, 3771–3778.
- Medawar, P.B. (1948). Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br. J. Exp. Pathol.* *29*, 58–69.
- Meekins, J.W., Pijnenborg, R., Hanssens, M., McFadyen, I.R., and van Asshe, A. (1994). A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe pre-eclamptic pregnancies. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* *101*, 669–674.
- Meinhardt, G., Haider, S., Haslinger, P., Proestling, K., Fiala, C., Pollheimer, J., and Knöfler, M. (2014). Wnt-dependent T-cell factor-4 controls human extravillous trophoblast motility. *Endocrinology* *155*, 1908–1920.

- Merviel, P., Challier, J.C., Carbillon, L., Foidart, J.M., and Uzan, S. (2001). The role of integrins in human embryo implantation. *Fetal Diagn. Ther.* *16*, 364–371.
- Merviel, P., Touzart, L., Deslandes, V., Delmas, M., Coicaud, M., and Gondry, J. (2008). [Risk factors of preeclampsia in single pregnancy]. *J. Gynécologie Obstétrique Biol. Reprod.* *37*, 477–482.
- Mesdag, V., Salzet, M., and Vinatier, D. (2014). [Trophoblast: conductor of the maternal immune tolerance]. *J. Gynécologie Obstétrique Biol. Reprod.* *43*, 657–670.
- Mesiano, S., and Welsh, T.N. (2007). Steroid hormone control of myometrial contractility and parturition. *Semin. Cell Dev. Biol.* *18*, 321–331.
- Miner, J.J., Cao, B., Govero, J., Smith, A.M., Fernandez, E., Cabrera, O.H., Garber, C., Noll, M., Klein, R.S., Noguchi, K.K., et al. (2016). Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. *Cell* *165*, 1081–1091.
- Mlakar, J., Korva, M., Tul, N., Popović, M., Poljšak-Prijatelj, M., Mraz, J., Kolenc, M., Resman Rus, K., Vesnaver Vipotnik, T., Fabjan Vodušek, V., et al. (2016). Zika Virus Associated with Microcephaly. *N. Engl. J. Med.* *374*, 951–958.
- Moffett, A., and Colucci, F. (2014). Uterine NK cells: active regulators at the maternal-fetal interface. *J. Clin. Invest.* *124*, 1872–1879.
- Moindjie, H., Santos, E.D., Loeuillet, L., Gronier, H., de Mazancourt, P., Barnea, E.R., Vialard, F., and Dieudonne, M.-N. (2014). Preimplantation factor (PIF) promotes human trophoblast invasion. *Biol. Reprod.* *91*, 118.
- Monkley, S.J., Delaney, S.J., Pennisi, D.J., Christiansen, J.H., and Wainwright, B.J. (1996). Targeted disruption of the Wnt2 gene results in placentation defects. *Dev. Camb. Engl.* *122*, 3343–3353.
- Morales-Prieto, D.M., Ospina-Prieto, S., Chaiwangyen, W., Schoenleben, M., and Markert, U.R. (2013). Pregnancy-associated miRNA-clusters. *J. Reprod. Immunol.* *97*, 51–61.
- Morrish, D.W., Bhardwaj, D., Dabbagh, L.K., Marusyk, H., and Siy, O. (1987). Epidermal growth factor induces differentiation and secretion of human chorionic gonadotropin and placental lactogen in normal human placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *65*, 1282–1290.
- Morton, H., Hegh, V., and Clunie, G.J. (1976). Studies of the rosette inhibition test in pregnant mice: evidence of immunosuppression? *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* *193*, 413–419.
- Morton, H., Rolfe, B., and Clunie, G.J. (1977). An early pregnancy factor detected in human serum by the rosette inhibition test. *Lancet Lond. Engl.* *1*, 394–397.
- Mueller, M., Zhou, J., Yang, L., Gao, Y., Wu, F., Schoeberlein, A., Surbek, D., Barnea, E.R., Paidas, M., and Huang, Y. (2014). Preimplantation factor promotes neuroprotection by targeting microRNA let-7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 13882–13887.

- Mueller, M., Schoeberlein, A., Zhou, J., Joerger-Messerli, M., Oppliger, B., Reinhart, U., Bordey, A., Surbek, D., Barnea, E.R., Huang, Y., et al. (2015). Preimplantation Factor bolsters neuroprotection via modulating Protein Kinase A and Protein Kinase C signaling. *Cell Death Differ.*
- Munro, A., Bewick, M., Manuel, L., Cameron, J.S., Ellis, F.G., Boulton-Jones, M., and Ogg, C.S. (1971). Clinical Evaluation of a Rosette Inhibition Test in Renal Allotransplantation. *Br. Med. J.* *3*, 271–276.
- Murakoshi, H., Matsuo, H., Laoag-Fernandez, J.B., Samoto, T., and Maruo, T. (2003). Expression of Fas/Fas-ligand, Bcl-2 protein and apoptosis in extravillous trophoblast along invasion to the decidua in human term placenta. *Endocr. J.* *50*, 199–207.
- Murphy, G. (2008). The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Cancer* *8*, 929–941.
- Nadar, S.K., Al Yemeni, E., Blann, A.D., and Lip, G.Y.H. (2004). Thrombomodulin, von Willebrand factor and E-selectin as plasma markers of endothelial damage/dysfunction and activation in pregnancy induced hypertension. *Thromb. Res.* *113*, 123–128.
- Nelson, T.R. (1955). A clinical study of pre-eclampsia. I. *J. Obstet. Gynaecol. Br. Emp.* *62*, 48–57.
- Niall, H.D. (1971). Revised primary structure for human growth hormone. *Nature. New Biol.* *230*, 90–91.
- Nielsen, P.V., Pedersen, H., and Kampmann, E.M. (1979). Absence of human placental lactogen in an otherwise uneventful pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *135*, 322–326.
- Nien, J.K., Mazaki-Tovi, S., Romero, R., Erez, O., Kusanovic, J.P., Gotsch, F., Pineles, B.L., Gomez, R., Edwin, S., Mazor, M., et al. (2007). Plasma adiponectin concentrations in non-pregnant, normal and overweight pregnant women. *J. Perinat. Med.* *35*, 522–531.
- Nishimura, T., Dunk, C., Lu, Y., Feng, X., Gellhaus, A., Winterhager, E., Rossant, J., and Lye, S.J. (2004). Gap junctions are required for trophoblast proliferation in early human placental development. *Placenta* *25*, 595–607.
- Ntrivalas, E.I., Kwak-Kim, J.Y., Gilman-Sachs, A., Chung-Bang, H., Ng, S.C., Beaman, K.D., Mantouvalos, H.P., and Beer, A.E. (2001). Status of peripheral blood natural killer cells in women with recurrent spontaneous abortions and infertility of unknown aetiology. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *16*, 855–861.
- Ogasawara, M., Aoki, K., Okada, S., and Suzumori, K. (2000). Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriages. *Fertil. Steril.* *73*, 300–304.
- O'Neill, C. (2005). The role of paf in embryo physiology. *Hum. Reprod. Update* *11*, 215–228.
- Ospina-Prieto, S., Chaiwangyen, W., Pastuschek, J., Schleussner, E., Markert, U.R., and Morales-Prieto, D.M. (2015). STAT5 is Activated by Epidermal Growth Factor and Induces

Proliferation and Invasion in Trophoblastic Cells. *Reprod. Sci. Thousand Oaks Calif* 22, 1358–1366.

Paidas, M.J., Krikun, G., Huang, S.J., Jones, R., Romano, M., Annunziato, J., and Barnea, E.R. (2010). A genomic and proteomic investigation of the impact of preimplantation factor on human decidual cells. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 202, 459.e1-8.

Paiva, P., Salamonsen, L.A., Manuelpillai, U., and Dimitriadis, E. (2009). Interleukin 11 inhibits human trophoblast invasion indicating a likely role in the decidual restraint of trophoblast invasion during placentation. *Biol. Reprod.* 80, 302–310.

Palmeira, P., Quinello, C., Silveira-Lessa, A.L., Zago, C.A., and Carneiro-Sampaio, M. (2012). IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. *Clin. Dev. Immunol.* 2012, 985646.

Pang, Z.-J., Zhou, J.-G., and Huang, L.-P. (2008). Interleukin-10 may participate in regulating trophoblast invasion in human placentae throughout gestation. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N* 1989 60, 19–25.

Parham, P. (2004). NK Cells and Trophoblasts. *J. Exp. Med.* 200, 951–955.

Park, H.K., and Ahima, R.S. (2013). Resistin in rodents and humans. *Diabetes Metab. J.* 37, 404–414.

Parr, B.A., Cornish, V.A., Cybulsky, M.I., and McMahon, A.P. (2001). Wnt7b regulates placental development in mice. *Dev. Biol.* 237, 324–332.

Perrier D’hauterive, S., Charlet-Renard, C., Goffin, F., Foidart, M., and Geenen, V. (2002). [The implantation window]. *J. Gynécologie Obstétrique Biol. Reprod.* 31, 440–455.

Petraglia, F., Vaughan, J., and Vale, W. (1989). Inhibin and activin modulate the release of gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin, and progesterone from cultured human placental cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 5114–5117.

Philippe Merviel, J.C. Challier (2001). *Implantation et placentation , Physiologie, pathologies et traitements.* (Elsevier-Masson), p. 328.

Piccinni, M.-P., Lombardelli, L., Logiodice, F., Kullolli, O., Romagnani, S., and Le Bouteiller, P. (2015). T helper cell mediated-tolerance towards fetal allograft in successful pregnancy. *Clin. Mol. Allergy CMA* 13, 9.

Pijnenborg, R., Vercruyse, L., and Hanssens, M. (2006). The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta* 27, 939–958.

Pineles, B.L., Romero, R., Montenegro, D., Tarca, A.L., Han, Y.M., Kim, Y.M., Draghici, S., Espinoza, J., Kusanovic, J.P., Mittal, P., et al. (2007). Distinct subsets of microRNAs are expressed differentially in the human placentas of patients with preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 196, 261.e1-6.

- Poehlmann, T.G., Fitzgerald, J.S., Meissner, A., Wengenmayer, T., Schleussner, E., Friedrich, K., and Markert, U.R. (2005). Trophoblast invasion: tuning through LIF, signalling via Stat3. *Placenta 26 Suppl A*, S37-41.
- Pourret, E., Hamamah, S., and Ait-Ahmed, O. (2016). [Biomarkers of the cumulus cells in medically assisted procreation: State-of-the-art]. *Gynecol. Obstet. Fertil.*
- Prutsch, N., Fock, V., Haslinger, P., Haider, S., Fiala, C., Pollheimer, J., and Knöfler, M. (2012). The role of interleukin-1 β in human trophoblast motility. *Placenta 33*, 696–703.
- Psychoyos, A. (1973). Hormonal control of ovoimplantation. *Vitam. Horm.* 31, 201–256.
- Qiu, Q., Yang, M., Tsang, B.K., and Gruslin, A. (2004). EGF-induced trophoblast secretion of MMP-9 and TIMP-1 involves activation of both PI3K and MAPK signalling pathways. *Reprod. Camb. Engl.* 128, 355–363.
- Qu, X., Yang, M., Zhang, W., Liang, L., Yang, Y., Zhang, Y., Deng, B., Gao, W., Liu, J., Yang, Q., et al. (2008). Osteopontin expression in human decidua is associated with decidual natural killer cells recruitment and regulated by progesterone. *Vivo Athens Greece* 22, 55–61.
- Quinn, C.E., and Casper, R.F. (2009). Pinopodes: a questionable role in endometrial receptivity. *Hum. Reprod. Update* 15, 229–236.
- Rajakumar, A., Cerdeira, A.S., Rana, S., Zsengeller, Z., Edmunds, L., Jeyabalan, A., Hubel, C.A., Stillman, I.E., Parikh, S.M., and Karumanchi, S.A. (2012). Transcriptionally active syncytial aggregates in the maternal circulation may contribute to circulating soluble fms-like tyrosine kinase 1 in preeclampsia. *Hypertension* 59, 256–264.
- Ramos, R.R., Swanson, A.J., and Bass, J. (2007). Calreticulin and Hsp90 stabilize the human insulin receptor and promote its mobility in the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 10470–10475.
- Ramu, S., Stamatkin, C., Timms, L., Ruble, M., Roussev, R.G., and Barnea, E.R. (2013). Preimplantation factor (PIF) detection in maternal circulation in early pregnancy correlates with live birth (bovine model). *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 11, 105.
- Reis, F.M., Petraglia, F., and Taylor, R.N. (2013). Endometriosis: hormone regulation and clinical consequences of chemotaxis and apoptosis. *Hum. Reprod. Update* 19, 406–418.
- Rigourd, V., Chauvet, C., Chelbi, S.T., Rebourcet, R., Mondon, F., Letourneur, F., Mignot, T.-M., Barboux, S., and Vaiman, D. (2008). STOX1 overexpression in choriocarcinoma cells mimics transcriptional alterations observed in preeclamptic placentas. *PLoS One* 3, e3905.
- Rogerson, S.J., Grau, G.E., and Hunt, N.H. (2004). The microcirculation in severe malaria. *Microcirc. N. Y. N* 1994 11, 559–576.
- Roussev, R.G., Barnea, E.R., Thomason, E.J., and Coulam, C.B. (1995). A novel bioassay for detection of preimplantation factor (PIF). *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N* 1989 33, 68–73.

- Roussev, R.G., Coulam, C.B., Kaider, B.D., Yarkoni, M., Leavis, P.C., and Barnea, E.R. (1996). Embryonic origin of preimplantation factor (PIF): biological activity and partial characterization. *Mol. Hum. Reprod.* 2, 883–887.
- Roussev, R.G., Dons'koi, B.V., Stamatkin, C., Ramu, S., Chernyshov, V.P., Coulam, C.B., and Barnea, E.R. (2013). Preimplantation factor inhibits circulating natural killer cell cytotoxicity and reduces CD69 expression: implications for recurrent pregnancy loss therapy. *Reprod. Biomed. Online* 26, 79–87.
- Ruddock, N.K., Shi, S.-Q., Jain, S., Moore, G., Hankins, G.D.V., Romero, R., and Garfield, R.E. (2008). Progesterone, but not 17-alpha-hydroxyprogesterone caproate, inhibits human myometrial contractions. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 199, 391.e1-7.
- Saito, S., Nakashima, A., Shima, T., and Ito, M. (2010). Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N 1989* 63, 601–610.
- Saleh, L., Otti, G.R., Fiala, C., Pollheimer, J., and Knöfler, M. (2011). Evaluation of human first trimester decidual and telomerase-transformed endometrial stromal cells as model systems of in vitro decidualization. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 9, 155.
- Sandra, O., Mansouri-Attia, N., and Lea, R.G. (2011). Novel aspects of endometrial function: a biological sensor of embryo quality and driver of pregnancy success. *Reprod. Fertil. Dev.* 24, 68–79.
- Sanz, G., Leray, I., Dewaele, A., Sobilo, J., Lerondel, S., Bouet, S., Grébert, D., Monnerie, R., Pajot-Augy, E., and Mir, L.M. (2014). Promotion of cancer cell invasiveness and metastasis emergence caused by olfactory receptor stimulation. *PloS One* 9, e85110.
- Scherdel, P., Botton, J., Rolland-Cachera, M.-F., Léger, J., Pelé, F., Ancel, P.Y., Simon, C., Castetbon, K., Salanave, B., Thibault, H., et al. (2015). Should the WHO growth charts be used in France? *PloS One* 10, e0120806.
- Schubring, C., Prohaska, F., Prohaska, A., Englaro, P., Blum, W., Siebler, T., Kratzsch, J., and Kiess, W. (1999). Leptin concentrations in maternal serum and amniotic fluid during the second trimester: differential relation to fetal gender and maternal morphometry. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 86, 151–157.
- Schumacher, A., Brachwitz, N., Sohr, S., Engeland, K., Langwisch, S., Dolaptchieva, M., Alexander, T., Taran, A., Malfertheiner, S.F., Costa, S.-D., et al. (2009). Human chorionic gonadotropin attracts regulatory T cells into the fetal-maternal interface during early human pregnancy. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182, 5488–5497.
- Sciarra, J.J., Sherwood, L.M., Varma, A.A., and Lundberg, W.B. (1968). Human placental lactogen (HPL) and placental weight. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 101, 413–416.
- Segond, N., Degrelle, S.A., Berndt, S., Clouqueur, E., Rouault, C., Saubamea, B., Dessen, P., Fong, K.S.K., Csiszar, K., Badet, J., et al. (2013). Transcriptome analysis of PPAR γ target genes

reveals the involvement of lysyl oxidase in human placental cytotrophoblast invasion. *PLoS One* 8, e79413.

Semenza, G.L. (2000). HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev.* 14, 1983–1991.

Seval, Y., Korgun, E.T., and Demir, R. (2007). Hofbauer cells in early human placenta: possible implications in vasculogenesis and angiogenesis. *Placenta* 28, 841–845.

Shainer, R., Azar, Y., Almogi-Hazan, O., Bringer, R., Compton, S.R., Paidas, M.J., Barnea, E.R., and Or, R. (2013). Immune Regulation and Oxidative Stress Reduction by Preimplantation Factor following Syngeneic or Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *Conf. Pap. Med.* 2013, 1–8.

Sharkey, A.M., King, A., Clark, D.E., Burrows, T.D., Jokhi, P.P., Charnock-Jones, D.S., Loke, Y.W., and Smith, S.K. (1999). Localization of leukemia inhibitory factor and its receptor in human placenta throughout pregnancy. *Biol. Reprod.* 60, 355–364.

Sharma, D., Shastri, S., Farahbakhsh, N., and Sharma, P. (2016a). Intrauterine growth restriction - part 1. *J. Matern.-Fetal Neonatal Med. Off. J. Eur. Assoc. Perinat. Med. Fed. Asia Ocean. Perinat. Soc. Int. Soc. Perinat. Obstet.* 1–11.

Sharma, S., Godbole, G., and Modi, D. (2016b). Decidual Control of Trophoblast Invasion. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N 1989* 75, 341–350.

Sharp, A.N., Heazell, A.E.P., Crocker, I.P., and Mor, G. (2010). Placental apoptosis in health and disease. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N 1989* 64, 159–169.

Sibai, B., Dekker, G., and Kupferminc, M. (2005). Pre-eclampsia. *Lancet Lond. Engl.* 365, 785–799.

Simón, C., Mercader, A., Gimeno, M.J., and Pellicer, A. (1997). The interleukin-1 system and human implantation. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N 1989* 37, 64–72.

Singh, M., Chaudhry, P., and Asselin, E. (2011). Bridging endometrial receptivity and implantation: network of hormones, cytokines, and growth factors. *J. Endocrinol.* 210, 5–14.

Snoek-van Beurden, P.A.M., and Von den Hoff, J.W. (2005). Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *BioTechniques* 38, 73–83.

Södersten, E., Lilja, T., and Hermanson, O. (2010). The novel BTB/POZ and zinc finger factor *Zbtb45* is essential for proper glial differentiation of neural and oligodendrocyte progenitor cells. *Cell Cycle Georget. Tex* 9, 4866–4875.

Staff, A.C., Ranheim, T., Khoury, J., and Henriksen, T. (1999). Increased contents of phospholipids, cholesterol, and lipid peroxides in decidua basalis in women with preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 180, 587–592.

- Staff, A.C., Benton, S.J., von Dadelszen, P., Roberts, J.M., Taylor, R.N., Powers, R.W., Charnock-Jones, D.S., and Redman, C.W.G. (2013). Redefining preeclampsia using placenta-derived biomarkers. *Hypertension* 61, 932–942.
- Stamatkin, C.W., Roussev, R.G., Stout, M., Absalon-Medina, V., Ramu, S., Goodman, C., Coulam, C.B., Gilbert, R.O., Godke, R.A., and Barnea, E.R. (2011a). Preimplantation Factor (PIF) correlates with early mammalian embryo development-bovine and murine models. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 9, 63.
- Stamatkin, C.W., Roussev, R.G., Stout, M., Coulam, C.B., Triche, E., Godke, R.A., and Barnea, E.R. (2011b). Preimplantation factor negates embryo toxicity and promotes embryo development in culture. *Reprod. Biomed. Online* 23, 517–524.
- Staun-Ram, E., and Shalev, E. (2005). Human trophoblast function during the implantation process. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 3, 56.
- Staun-Ram, E., Goldman, S., Gabarin, D., and Shalev, E. (2004). Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 2, 59.
- Stewart, C.L., Kaspar, P., Brunet, L.J., Bhatt, H., Gadi, I., Köntgen, F., and Abbondanzo, S.J. (1992). Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor. *Nature* 359, 76–79.
- Straszewski-Chavez, S.L., Abrahams, V.M., and Mor, G. (2005). The role of apoptosis in the regulation of trophoblast survival and differentiation during pregnancy. *Endocr. Rev.* 26, 877–897.
- Suman, P., Shembekar, N., and Gupta, S.K. (2013). Leukemia inhibitory factor increases the invasiveness of trophoblastic cells through integrated increase in the expression of adhesion molecules and pappalysin 1 with a concomitant decrease in the expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases. *Fertil. Steril.* 99, 533–542.
- Sykes, L., MacIntyre, D.A., Yap, X.J., Teoh, T.G., and Bennett, P.R. (2012). The Th1:th2 dichotomy of pregnancy and preterm labour. *Mediators Inflamm.* 2012, 967629.
- Takano, M., Lu, Z., Goto, T., Fusi, L., Higham, J., Francis, J., Withey, A., Hardt, J., Cloke, B., Stavropoulou, A.V., et al. (2007). Transcriptional cross talk between the forkhead transcription factor forkhead box O1A and the progesterone receptor coordinates cell cycle regulation and differentiation in human endometrial stromal cells. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 21, 2334–2349.
- Tang, C.-L., Zhao, H.-B., Li, M.-Q., Du, M.-R., Meng, Y.-H., and Li, D.-J. (2012). Focal adhesion kinase signaling is necessary for the Cyclosporin A-enhanced migration and invasion of human trophoblast cells. *Placenta* 33, 704–711.

- Tannetta, D.S., Dragovic, R.A., Gardiner, C., Redman, C.W., and Sargent, I.L. (2013). Characterisation of syncytiotrophoblast vesicles in normal pregnancy and pre-eclampsia: expression of Flt-1 and endoglin. *PLoS One* 8, e56754.
- Tarrade, A., Lai Kuen, R., Malassiné, A., Tricottet, V., Blain, P., Vidaud, M., and Evain-Brion, D. (2001a). Characterization of human villous and extravillous trophoblasts isolated from first trimester placenta. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 81, 1199–1211.
- Tarrade, A., Schoonjans, K., Guibourdenche, J., Bidart, J.M., Vidaud, M., Auwerx, J., Rochette-Egly, C., and Evain-Brion, D. (2001b). PPAR gamma/RXR alpha heterodimers are involved in human CG beta synthesis and human trophoblast differentiation. *Endocrinology* 142, 4504–4514.
- Teles, A., Schumacher, A., Kühnle, M.-C., Linzke, N., Thuere, C., Reichardt, P., Tadokoro, C.E., Hämmerling, G.J., and Zenclussen, A.C. (2013). Control of uterine microenvironment by foxp3(+) cells facilitates embryo implantation. *Front. Immunol.* 4, 158.
- Toro, A.R., Maymó, J.L., Ibarbalz, F.M., Pérez-Pérez, A., Maskin, B., Faletti, A.G., Sánchez-Margalet, V., and Varone, C.L. (2014). Leptin is an anti-apoptotic effector in placental cells involving p53 downregulation. *PLoS One* 9, e99187.
- Wamstad, J.A., Corcoran, C.M., Keating, A.M., and Bardwell, V.J. (2008). Role of the transcriptional corepressor Bcor in embryonic stem cell differentiation and early embryonic development. *PLoS One* 3, e2814.
- Wang, W.S., Liu, C., Li, W.J., Zhu, P., Li, J.N., and Sun, K. (2014). Involvement of CRH and hCG in the induction of aromatase by cortisol in human placental syncytiotrophoblasts. *Placenta* 35, 30–36.
- Weiss, L., Bernstein, S., Jones, R., Amunugama, R., Krizman, D., JeBailey, L., Almogi-Hazan, O., Hazan, O., Yekhtin, Z., Yachtin, J., et al. (2011). Preimplantation factor (PIF) analog prevents type I diabetes mellitus (T1DM) development by preserving pancreatic function in NOD mice. *Endocrine* 40, 41–54.
- Weiss, L., Or, R., Jones, R.C., Amunugama, R., JeBailey, L., Ramu, S., Bernstein, S.A., Yekhtin, Z., Almogi-Hazan, O., Shainer, R., et al. (2012). Preimplantation factor (PIF*) reverses neuroinflammation while promoting neural repair in EAE model. *J. Neurol. Sci.* 312, 146–157.
- Wells, J.M., Gaggari, A., and Blalock, J.E. (2015). MMP generated Matrikines. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 44–46, 122–129.
- Whitley, G.S.J., and Cartwright, J.E. (2010). Cellular and molecular regulation of spiral artery remodelling: lessons from the cardiovascular field. *Placenta* 31, 465–474.
- Winterhager, E., and Kidder, G.M. (2015). Gap junction connexins in female reproductive organs: implications for women's reproductive health. *Hum. Reprod. Update* 21, 340–352.
- World Health Organization International Collaborative Study of Hypertensive Disorders of Pregnancy (1988). Geographic variation in the incidence of hypertension in pregnancy.

World Health Organization International Collaborative Study of Hypertensive Disorders of Pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 158, 80–83.

Wright, J.K., Dunk, C.E., Perkins, J.E., Winterhager, E., Kingdom, J.C.P., and Lye, S.J. (2006). EGF modulates trophoblast migration through regulation of Connexin 40. *Placenta* 27 *Suppl A*, S114–121.

Wu, X., Jin, L.-P., Yuan, M.-M., Zhu, Y., Wang, M.-Y., and Li, D.-J. (2005). Human first-trimester trophoblast cells recruit CD56^{bright}CD16⁻ NK cells into decidua by way of expressing and secreting of CXCL12/stromal cell-derived factor 1. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 175, 61–68.

Wu, Y.-H., Lo, H.-F., Chen, S.-H., and Chen, H. (2013). Caspase-14 suppresses GCM1 acetylation and inhibits placental cell differentiation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 27, 2818–2828.

Xie, Y., Cui, D., Sui, L., Xu, Y., Zhang, N., Ma, Y., Li, Y., and Kong, Y. (2015). Induction of forkhead box M1 (FoxM1) by EGF through ERK signaling pathway promotes trophoblast cell invasion. *Cell Tissue Res.* 362, 421–430.

Xu, L.L., Stackhouse, B.G., Florence, K., Zhang, W., Shanmugam, N., Sesterhenn, I.A., Zou, Z., Srikantan, V., Augustus, M., Roschke, V., et al. (2000). PSGR, a novel prostate-specific gene with homology to a G protein-coupled receptor, is overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res.* 60, 6568–6572.

Xue, Z., Huang, K., Cai, C., Cai, L., Jiang, C., Feng, Y., Liu, Z., Zeng, Q., Cheng, L., Sun, Y.E., et al. (2013). Genetic programs in human and mouse early embryos revealed by single-cell RNA sequencing. *Nature* 500, 593–597.

Yan, L., Yang, M., Guo, H., Yang, L., Wu, J., Li, R., Liu, P., Lian, Y., Zheng, X., Yan, J., et al. (2013). Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 1131–1139.

Yang, Q., Chen, S.-P., Zhang, X.-P., Wang, H., Zhu, C., and Lin, H.-Y. (2009). Smurf2 participates in human trophoblast cell invasion by inhibiting TGF-beta type I receptor. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 57, 605–612.

Yasunaga, S., 'ichiro, Ohtsubo, M., Ohno, Y., Saeki, K., Kurogi, T., Tanaka-Okamoto, M., Ishizaki, H., Shirai, M., Mihara, K., Brock, H.W., et al. (2013). Scmh1 Has E3 Ubiquitin Ligase Activity for Geminin and Histone H2A and Regulates Geminin Stability Directly or Indirectly via Transcriptional Repression of Hoxa9 and Hoxb4. *Mol. Cell. Biol.* 33, 644–660.

Young, O.M., Tang, Z., Niven-Fairchild, T., Tadesse, S., Krikun, G., Norwitz, E.R., Mor, G., Abrahams, V.M., and Guller, S. (2015). Toll-like receptor-mediated responses by placental Hofbauer cells (HBCs): a potential pro-inflammatory role for fetal M2 macrophages. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N* 1989 73, 22–35.

Zakar, T., and Hertelendy, F. (2007). Progesterone withdrawal: key to parturition. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *196*, 289–296.

Zeck, W., Widberg, C., Maylin, E., Desoye, G., Lang, U., McIntyre, D., Prins, J., and Russell, A. (2008). Regulation of placental growth hormone secretion in a human trophoblast model--the effects of hormones and adipokines. *Pediatr. Res.* *63*, 353–357.

Zeisler, H., Llurba, E., Chantraine, F., Vatish, M., Staff, A.C., Sennström, M., Olovsson, M., Brennecke, S.P., Stepan, H., Allegranza, D., et al. (2016). Predictive Value of the sFlt-1:PIGF Ratio in Women with Suspected Preeclampsia. *N. Engl. J. Med.* *374*, 13–22.

Zhang, Y., Fei, M., Xue, G., Zhou, Q., Jia, Y., Li, L., Xin, H., and Sun, S. (2012). Elevated levels of hypoxia-inducible microRNA-210 in pre-eclampsia: new insights into molecular mechanisms for the disease. *J. Cell. Mol. Med.* *16*, 249–259.

Zhou, Y., Damsky, C.H., and Fisher, S.J. (1997). Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J. Clin. Invest.* *99*, 2152–2164.

Zhu, H., Hou, C.-C., Luo, L.-F., Hu, Y.-J., and Yang, W.-X. (2014). Endometrial stromal cells and decidualized stromal cells: origins, transformation and functions. *Gene* *551*, 1–14.

Annexes

Article 4

Implication du récepteur apparenté aux récepteurs des oestrogènes- γ et du contenu mitochondrial dans le retard de croissance intra-utérin et la pré-éclampsie

Article 4

Involvement of estrogen-related receptor- γ and mitochondrial content in intrauterine growth restriction and preeclampsia

Dorothee Poidatz, Esther Dos Santos, Fabien Duval, Hadia Moindjie, Valérie Serazin, François Vialard, Philippe De Mazancourt, and Marie-Noëlle Dieudonné

FERTILITY AND STERILITY (2015) Aug; 104(2):483-90.

Article 5

L'hormone anti-müllérienne recrute le co-récepteur BMPR-1A dans les cellules de la granulosa immatures

Article 5

Anti-Müllerian hormone recruits BMPR-1A in immature granulosa cells

Sèdes L, Leclerc A, Moindjie H, Cate RL, Picard JY, di Clemente N, Jamin SP.

PLOS ONE (2013) Nov 28; 8(11):e81551.

Rôles du Facteur PréImplantatoire (PIF) dans le placenta humain normal et pathologique

Mots clés : Facteur PréImplantatoire (PIF), Placentation humaine, Invasion trophoblastique, Apoptose, Voies de signalisation, Pathologies de la grossesse

Résumé : Le placenta humain est un organe indispensable au bon déroulement de la grossesse. La villosité choriale est l'unité structurale et fonctionnelle du placenta. Elle est constituée essentiellement de cellules trophoblastiques. Les cytotrophoblastes extra-villeux (CTEV) présentent des propriétés invasives et assurent l'ancrage du placenta dans l'endomètre maternel. De plus, une apoptose physiologique assure le renouvellement des cytotrophoblastes tout au long de la grossesse.

Le Facteur Préimplantatoire (PIF) est un peptide de 15 acides aminés, sécrété par des embryons viables. Le PIF exerce un effet autocrine positif sur le développement embryonnaire. Le PIF est également impliqué dans le contrôle de l'immunité et de l'inflammation dans divers types cellulaires.

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux rôles du PIF dans le développement placentaire humain. Dans un premier temps, nous avons caractérisé l'expression protéique du PIF dans des placentas humains de 1^{er} et 3^{ème} trimestre de grossesse.

Nous avons montré que i) l'expression du PIF diminue au cours de la grossesse et ii) le PIF est majoritairement exprimé dans les CTEV.

Dans un second temps, nous avons mis en évidence que le PIF i) favorise l'invasion trophoblaste et ii) inhibe l'apoptose des CTEV en régulant la voie de signalisation de p53.

Par ailleurs, des altérations de l'invasion et de l'apoptose trophoblastiques sont associées à des pathologies de la grossesse telles que la pré-éclampsie et le retard de croissance intra-utérin. Ainsi, dans un dernier temps nous avons montré que l'expression du PIF est diminuée dans des placentas humains de 3^{ème} trimestre issus de grossesses pathologiques par comparaison avec des grossesses normales.

L'ensemble de ces résultats démontrent que le PIF est un nouvel acteur de la placentation humaine. De plus, le PIF pourrait être considéré comme un nouveau biomarqueur des pathologies de la grossesse.

PreImplantation Factor roles in human normal and pathologic placenta

Keywords : PreImplantation Factor (PIF), Human placentation, Trophoblastic invasion, Apoptosis, Signaling pathways, Pregnancy pathologies

Abstract : Human placentation is a critical step in the establishment of a successful pregnancy. The chorionic villus constitutes the structural and functional unit of the placenta. The extravillous trophoblast (EVT) is a placental cell type that differentiates from the highly proliferative cytotrophoblast located at the base of the anchoring villous. EVT have invasive properties, essential for placenta anchoring in the endometrium and uterine artery remodeling. Moreover, programmed cell death is an active process required for normal trophoblastic cell turnover during pregnancy.

PreImplantation Factor (PIF) is a 15-amino-acid peptide secreted by developing embryos. PIF exerts autotrophic and protective effects on the embryo. PIF is also implicated in the control of immune and inflammatory processes in various cell types.

In this work, we aimed to determine the direct effects of PIF on human placental development.

In a first part, we characterized PIF protein expression in first and third trimester human placentas. We showed that PIF protein expression i) decreased over the course of the pregnancy and ii) was higher in EVT compared to villous trophoblast.

In a second part, we showed that PIF i) enhanced pro-invasive capacities and ii) prevented cell death by regulating p53 signaling pathway in human EVT. Dysregulation of trophoblastic invasion and apoptosis have been associated with pregnancy pathologies. Thereby, in a last part, we showed that PIF protein expression was lower in placentas from preeclampsia and intra-uterine growth restriction as compared with non-pathological placentas. Altogether, we highlighted for the first time, that PIF is a new positive regulator of placental functions. PIF could be considered as a novel biomarker of a favorable outcome of pregnancy.

