



HAL
open science

Les membranes foetales humaines : une interface materno-foetale en situation physiologique et physiopathologique

Louis Marcellin

► **To cite this version:**

Louis Marcellin. Les membranes foetales humaines : une interface materno-foetale en situation physiologique et physiopathologique. Biologie moléculaire. Université Sorbonne Paris Cité, 2015. Français. NNT : 2015USPCB159 . tel-01578489

HAL Id: tel-01578489

<https://theses.hal.science/tel-01578489>

Submitted on 29 Aug 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.

UNIVERSITE PARIS DESCARTES

Thèse

pour obtenir le grade de

Docteur

Sciences de la Vie et de la Santé

Ecole Doctorale Bio Sorbonne Paris Cité

Spécialité: Biologie Cellulaire et Moléculaire

Présentée et soutenue publiquement

par Louis Marcellin

le 25 novembre 2015

**Sujet : Les membranes fœtales humaines,
une interface materno-fœtale en situation physiologique et physiopathologique**

Jury :

Professeur Marc Delpech

Docteur Céline Méhats

Docteur Gérard Chaouat

Docteur Loïc Blanchon

Docteur Olivier Sandra

Professeur Charles Chapron

Professeur François Goffinet

Professeur Thomas Schmitz

Président

Directeur de thèse

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur invité

Examineur invité

A Matthieu,

Remerciements

Monsieur le Professeur Marc Delpech, vous me faites l'honneur de présider le jury de cette thèse,

Madame le Docteur Céline Méhats, pour avoir dirigé ce travail et de m'avoir consacré un temps précieux. Sa compétence, sa rigueur scientifique et sa clairvoyance m'ont beaucoup appris. Je lui sais gré de m'avoir encouragé à poursuivre et à mener à son terme ces travaux avec toute la ténacité nécessaire.

Monsieur le Docteur Gérard Chaouat, pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse,

Monsieur le Docteur Loïc Blanchon, pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse,

Monsieur le Docteur Olivier Sandra, pour avoir accepté de juger ce travail,

Monsieur le Professeur Charles Chapron et Monsieur le Professeur François Goffinet,
pour votre confiance, vos encouragements et la disponibilité que vous m'avez accordés pour la réalisation de ce travail pendant mon clinicat,
pour avoir accepté de juger ce travail,

Monsieur le Professeur Thomas Schmitz,
pour m'avoir entraîné dans cette palpitante mais houleuse voie de la recherche,
pour avoir accepté de juger ce travail,

Monsieur le Professeur Dominique Cabrol,

Monsieur le Professeur Bertrand Dousset, pour vos constants encouragements,

L'ensemble de l'équipe du laboratoire, et plus particulièrement le Docteur Daniel Vaiman, le Docteur Michelle Breuiller-Fouché et Madame Françoise Mondon, le Docteur Sandrine Barboux, le Docteur Julie Cocquet, le Docteur Ahmed Ziyat, le Docteur Brigitte Lefèvre, le Docteur Anne Caignard, Meriem Messaoudene, Sébastien Jacques, Jeremy Delaire, et Cécile Morin, pour votre aide et votre soutien,

Monsieur le Docteur Jean Gogusev et Monsieur le Professeur Marc Felous, pour votre constant positivisme hautement inspirant,

Monsieur le Professeur Guy Gorochoy, Driss Chader et Christophe Parizot pour votre aide dans la réalisation de ce travail,

Madame Marie-Ange Ventura, Madame Sandrine Chouzenoux, Madame Michèle Pitte pour votre soutien et votre patience,

Mes collègues pour leurs encouragements, les internes pour leur patience,

Bérénice Bonnet-Eymard pour sa relecture précieuse et bien plus encore,

Pietro,

Edith, Philipe et Alexandre Merle, pour votre soutien bienveillant,

Caroline pour tout et *tous ceux* qui arrivent.

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Résumé

PARTIE 1 : INTRODUCTION

1	L'utérus humain.....	12
2	Anatomie fonctionnelle de l'endomètre.....	14
2.1	Généralités	14
2.2	Leucocytes endométriaux	17
2.3	La décidualisation	18
2.4	Régulation de la décidualisation	20
3	Interface materno-fœtale.....	23
3.1	Le placenta.....	24
3.2	Les membranes fœtales.....	26
3.3	Anatomie descriptive des membranes fœtales.....	27
3.4	Les cellules fœtales circulantes.....	31
4	Quand l'endomètre est malade : l'endométriose.....	32
4.1	Définition et généralité sur l'endométriose.....	32
4.2	Physiopathologie de l'endométriose.....	34
4.3	Grossesse chez les femmes atteintes d'endométriose	37
4.3.1	Retentissement de la grossesse sur l'endométriose	37
4.3.2	Retentissement de l'endométriose sur le déroulement de la grossesse	38
5	la parturition humaine.....	42
5.1	La contraction utérine	42
5.2	Les modifications cervicales.....	46
5.3	La rupture physiologique des membranes fœtales.....	48
5.4	Déterminisme de la parturition	49
6	Aspects immunologiques de la grossesse	61
6.1	Principaux acteurs immunitaires à l'interface materno-fœtale	63
6.2	Cellules Natural Killer	63
6.3	Macrophages	68
6.4	Cellules dendritiques.....	70
6.5	Lymphocytes.....	71

PARTIE 2 : DEMARCHE EXPERIMENTALE

1	Problématique	76
2	Matériel et méthodes.....	78
2.1	Prélèvements de tissus humains.....	78
2.2	Echantillon de choriocidua.....	78
2.3	Extraction des ARN totaux et RT-PCR.....	79
2.4	Analyse du transcriptome et traitement des données.....	79
2.5	PCR quantitative	81
2.6	Extraction d'ADN génomique.....	83
2.7	Analyse du méthylome	83
2.8	Cytométrie de flux	84
2.9	Immunohistochimie	84
2.10	Microscopie électronique.....	86
2.11	Analyse statistique	86
3	Article 1	87
	Local loss of maternal-fetal tolerance precedes parturition in Humans	87
4	Article 2	91
	Endometriosis also affects the fetal membranes during pregnancy.....	126
5	Conclusions.....	132

PARTIE 3 : PERSPECTIVES

1.1	Trohy2 : marqueurs du remodelage choriocidua dans les sécretions cervico-vaginales	148
1.2	EndObst : étude prospective multicentrique des conséquence périnatales de l'endométrie.....	149
	Références	172

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine triphosphate
CD	Cluster différenciation
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
COX-1	Cyclo-oxygénase-1 (alias PTGS1)
COX-2	Cyclo-oxygénase-2 (alias PTGS2)
CREB	cAMP response element binding protein
CRH	Cortisol relasing hormone
DIE	Endométriose pelvienne profonde
E2	Oestradiol
EGF	Epithelial Growth Factor
EPC	Cellules progénitrices endothéliales
IGFBP-1	Insulin growth factor binding protein
FGF	Fibroblast Growth Factor
FSH	Folliculing relaising hormone
HLA	Human Leukocyte antigen
IL	Interleukine
IMC	Index de masse corporelle
KIR	Killer inhibiting receptor
KO	Knocked out
LH	Luteinizing hormone
MEC	Matrice extra-cellulaire
MIF	Macrophage migration inhibitory factor
MLC	Myosin Light Chain
MLCK	Myosin Light Chain Kinase
MMP	Métalloprotéinase matricielle
NK	Natural killer
OMA	Endométriome
PDGF	Platelet derived growth factor
PGE2	Prostaglandine E2
PI3K	Phosphoinositide-3 Kinase
PLC	Phospholipase C
PLGF	Placental growth factor
PR	Progesterone receptor
PRL	Prolactine
PTGS	Prostaglandine endoperoxide synthétase (alias COX-)
RIN	RNA integrity number
RPM	rupture prématurée des membranes
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SA	Semaine d'aménorrhée
TGF- β	Transforming growth factor beta
TIMPs	Tissue inhibitors of metalloproteinases
TLR	Toll like receptor
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

RESUME

La grossesse reste une situation physiologique unique où l'organisme maternel accepte et accompagne en son sein l'invasion et le développement d'un être distinct. L'interface materno-fœtale reçoit, transmet et exécute les messages à la fois maternels et fœtaux, nécessaires à l'évolution de la grossesse. Cette interface éphémère comprend la décidue maternelle, le placenta et les membranes fœtales –amnios et chorion.

En dépit de leur accessibilité après la délivrance, ces dernières sont à ce jour encore peu étudiées alors qu'elles ont un rôle déterminant dans la contention stérile du *conceptus* et du liquide amniotique. Leurs fonctions de barrière physique, métabolique et immunologique et leur signalisation paracrine au contact du myomètre et du col utérin en font un objet d'étude de premier ordre. La question de la perturbation de ces signaux dans un contexte de pathologie gynécologique bénigne telle que l'endométriose n'est pas résolue.

Plusieurs semaines avant la mise en route du travail obstétrical, un remodelage focal de membranes fœtales en regard du col peut être observé. Ces changements biochimiques sont liés aux mécanismes qui participent à la parturition.

L'objectif de ce travail de thèse est de caractériser les changements d'ordre génomique, épigénomique et/ou cellulaire des membranes fœtales qui peuvent survenir en prémices de la parturition en situation normale et dans une situation pathologique où la décidue est malade chez les femmes atteintes d'endométriose.

Nous avons ainsi mis en évidence une signature locale inédite après 37 semaines d'aménorrhée de perte de tolérance materno-fœtale associant activation des cellules Natural Killers et des macrophages déciduaux et un changement de phénotype des trophoblastes des membranes fœtales. Ceux-ci présentent *de novo* à leur surface des molécules HLA de classe I classiques. L'ensemble s'apparente à un rejet de la « semi »-allogreffe fœtale, qui pourra évoluer vers une inflammation stérile de la sphère utéro-placentaire et la parturition.

Nous avons montré pour la première fois la présence de nodules ressemblant à des lésions d'endométriose dans la décidue au contact des membranes fœtales chez des femmes enceintes atteintes d'endométriose. Au niveau moléculaire, nous y avons identifié des changements d'expression et de méthylation de gènes impliqués dans l'auto-immunité, la néovascularisation et la neurogénèse. Ces modifications renseignent sur la capacité *per se* de la décidue chez des femmes atteintes d'endométriose à spontanément former des lésions au contact de tissus non utérins. Ces résultats posent aussi la question de risques accrus chez ces femmes pendant la grossesse.

Ce travail répond à un besoin clinique pressant : celui de comprendre la physiopathologie de la parturition et des mécanismes qui peuvent être en relation avec un accouchement prématuré, et ce afin d'améliorer la stratification du risque d'accouchement prématuré. A ce titre, les résultats obtenus au cours de ce travail ont permis de mettre en place deux études cliniques aujourd'hui en cours, TrophY² -évaluation de nouveaux marqueurs de mise en route du travail- et EndObst – impact périnatal de l'endométriose, étude multicentrique.

PARTIE 1 : INTRODUCTION

Préambule

Au cours de l'accouchement, trois événements se synchronisent pour permettre la naissance du fœtus: la maturation du col, les contractions du myomètre et la rupture des membranes fœtales [1, 2]. A ce jour, le déterminisme de la parturition humaine reste peu élucidé. Il représente cependant un enjeu d'importance dans le but de pouvoir prédire, voire contrôler, la survenue de l'accouchement.

Les recherches de ces cinquante dernières années se sont plutôt orientées sur le myomètre -pour contrôler les contractions utérines- ou sur le col -pour agir sur sa maturation. La « poche des eaux » est souvent considérée comme un vulgaire sac et les membranes fœtales ont fait l'objet de moins d'attention. Leur physiopathologie est mal connue. Pourtant dès 1977, Sir Liggins suggérait que: "*Labor in human pregnancy may be initiated mainly by a genetically-controlled maturational signal arising in the fetal membrane and expressing itself through an interaction with the deciduum; fetal and maternal hormone may play a lesser, dispensable part*" [1].

Les membranes fœtales ont pour rôle princeps de retenir le liquide amniotique dans la cavité amniotique. Ces membranes sont soumises à deux contraintes principales : une contrainte mécanique, d'une part, liée à l'étirement de la cavité amniotique en rapport avec la croissance et les mouvements du fœtus, aux fluctuations du liquide amniotique et à l'inertie relative du myomètre, et une contrainte immunologique, d'autre part, liée à la cohabitation de cellules trophoblastiques fœtales avec les cellules déciduales maternelles de patrimoine génétique différent.

La rupture des membranes est définie par la rupture du chorion et de l'amnios, associée à un écoulement de liquide amniotique. Elle survient de façon physiologique au

cours du travail obstétrical. Cette rupture est dite prématurée lorsqu'elle se produit avant le début du travail. La rupture prématurée des membranes (RPM) complique 5 à 10 % des grossesses [3]. La RPM peut se produire à terme (supérieur à 37 semaines d'aménorrhée - SA) ou avant terme (inférieur à 37 SA). A terme, une RPM survient chez 8 à 10 % des femmes et le risque d'infection croît avec le délai entre la rupture et l'accouchement [4]. Une RPM avant terme complique 2 à 3,5 % des grossesses. Cette RPM précoce est responsable de 30 à 40 % des accouchements prématurés [3].

Que ce soit à terme ou avant terme, la RPM est en rapport avec une fragilisation excessive de la structure des membranes. Les causes d'une RPM sont multiples et la physiopathologie reste mal comprise. Dans quelle mesure et jusqu'à quel point les mécanismes de la rupture physiologique, de la RPM à terme et de la RPM avant terme sont communs ou différents restent à éclairer. Par ailleurs, l'impact que pourrait avoir les pathologies utérines bénignes et fréquentes, telle que l'endométriose, sur l'endomètre et les membranes fœtales et le cours de la grossesse n'est pas connu.

Au début de ce travail, nous faisons l'hypothèse que la RPM peut être, en partie, la conséquence d'une dissociation pathologique des mécanismes qui concourent à l'accouchement en rapport avec une perturbation des dialogues cellulaires à l'interface materno-fœtale. Cette perturbation serait alors associée à une altération de la structure physique des membranes, responsable de leur fragilisation, et *in fine* de leur rupture.

1 L'UTERUS HUMAIN

Les principales fonctions de l'utérus sont de garantir la survie préimplantatoire de l'embryon fécondé aux stades de la morula puis du blastocyste, de créer un environnement propice à l'implantation, de soutenir le développement harmonieux du fœtus et du placenta et de permettre l'accouchement et la délivrance au terme physiologique de la grossesse.

L'utérus humain est un organe pelvien impair et médian en forme de poire inversée, situé entre le rectum en arrière et la vessie en avant. C'est un organe musculaire piriforme et creux, constitué d'une paroi formée de trois tuniques concentriques avec de la périphérie vers le centre : une tunique séreuse externe, le périmètre, une tunique musculaire épaisse, le myomètre, et un revêtement muqueux interne qui tapisse la cavité utérine, l'endomètre.

Le myomètre est principalement constitué de fibres musculaires lisses regroupées en faisceaux soutenus par des fibres élastiques et disposées en trois couches. La couche externe contient des fibres musculaires orientées longitudinalement, la couche intermédiaire est richement vascularisée et à dominance conjonctive, la couche la plus interne, appelée couche circulaire, forme un anneau autour de la cavité utérine, les fibres musculaires étant orientées parallèlement au stroma de l'endomètre. Dans le myomètre, les fibres musculaires sont réparties selon un gradient décroissant entre le fond de l'utérus (69 %) et le col (10 %), permettant d'orienter les contractions utérines nécessaires à l'expulsion du fœtus au moment de l'accouchement vers le vagin. L'endomètre formé d'un épithélium unistratifié, prismatique et glandulaire, repose par l'intermédiaire d'une lame basale sur un tissu conjonctif. Ce stroma, très vascularisé, contient les artères spiralées, branches des artères utérines, et un système de drainage veineux. L'endomètre est le siège de modifications structurales importantes suivant l'âge, le cycle menstruel et la gestation, qui feront l'objet d'une description plus détaillée ci-après.

En dehors de la grossesse, l'utérus mesure 6 à 8 cm de grand axe et 4 cm de large. Le corps de l'utérus est composé du fond utérin, des bords latéraux qui sont épais et de l'isthme dans sa partie inférieure, qui le sépare du col ; ce dernier fait saillie dans le vagin. De part et d'autre du fond utérin s'implantent les trompes de Fallope au niveau des cornes utérines. La cavité utérine est une cavité virtuelle de forme triangulaire, à base fundique, se rétrécissant au niveau de l'isthme et débouchant sur le canal cervical. L'utérus gravide se développe dans l'abdomen avec des modifications volumétriques et structurales concomitantes de l'avancement de la grossesse. Au cours des six premiers mois de grossesse, l'accroissement du volume utérin se fait au niveau du corps. Au cours du troisième trimestre chez la nullipare (et plus tardivement chez la multipare) se forme le segment inférieur de l'utérus. Ce segment correspond à la partie amincie de l'utérus gravide, située entre le corps et le col qui se développe aux dépens de l'isthme utérin et de la partie supérieure du col. Son allongement est associé à la dilatation cervicale au cours du travail obstétrical.

Au décours de l'accouchement, et bien qu'il soit en cours de rétraction juste après la naissance, l'utérus pèse en moyenne 1,5 kg et mesure entre 20 et 24 cm de grand axe, le 1^{er} jour, et 11 à 13 cm, le 6^{ème} jour du post-partum [5].

2 ANATOMIE FONCTIONNELLE DE L'ENDOMETRE

2.1 Généralités

L'endomètre humain subit une dégradation et une régénération cyclique durant toute la période d'activité génitale, de la puberté à la ménopause, sous l'action de l'œstrogène et la progestérone régulée par l'axe hypothalamo-hypophysio-ovarien.

Chez une femme en âge de procréer, deux couches de l'endomètre peuvent être distinguées : la couche fonctionnelle (2/3) et la couche basale (1/3). La couche fonctionnelle borde la cavité utérine et se forme à la fin des règles, au cours de la première partie du cycle menstruel. La couche basale, adjacente au myomètre sous la couche fonctionnelle, ne desquame pas au cours du cycle menstruel. Elle est la couche à partir de laquelle se développe la couche fonctionnelle.

Dans les conditions normales, au cours de la première moitié du cycle menstruel – la phase proliférative ou folliculaire qui débute à la fin des règles, soit le 4^{ème} jour du cycle, et s'achève le 14^{ème} jour pour un cycle de 28 jours – l'endomètre est le siège d'une prolifération en réponse à la sécrétion d'œstrogènes par les follicules ovariens. L'épithélium utérin desquamé au cours des règles précédentes se régénère à ce stade grâce à une forte activité mitotique des cellules épithéliales dont quelques-unes deviennent ciliées. Le compartiment stromal est aussi le siège d'une activité proliférative augmentée ; les glandes du stroma endométrial s'allongent et les artères spiralées deviennent légèrement contournées.

Après l'ovulation, au cours de la deuxième moitié du cycle menstruel – la phase sécrétoire ou lutéale qui débute après l'ovulation – l'endomètre subit un phénomène de transformation appelé décidualisation (détaillée ci-après). Ce processus commence avec une augmentation de la sécrétion de progestérone par le corps jaune. L'endomètre se différencie et

atteint sa maturité : les glandes deviennent tortueuses et les artères sinueuses. Le stroma conjonctif est le siège de transformations œdémateuses.

La prolifération reprend autour du 22-23^{ème} jour quand l'œdème régresse et une réaction dite pré-déciduale s'initie autour de la portion terminale des artères spiralées. En l'absence de fécondation, et donc d'un blastocyste, l'involution du corps jaune est associée à une chute de la progestérone. A la fin de la phase sécrétoire, en fin du cycle, la couche superficielle devient de plus en plus compacte. Le stroma est le siège d'une infiltration leucocytaire massive pendant les 2-3 derniers jours du cycle et en réponse à cette baisse des niveaux de progestérone, l'endomètre se nécrose. Il survient une desquamation spontanée de la couche fonctionnelle de l'endomètre, qui conduit à l'excrétion menstruelle évacuée par les voies génitales au cours des règles au début du cycle menstruel suivant [6].

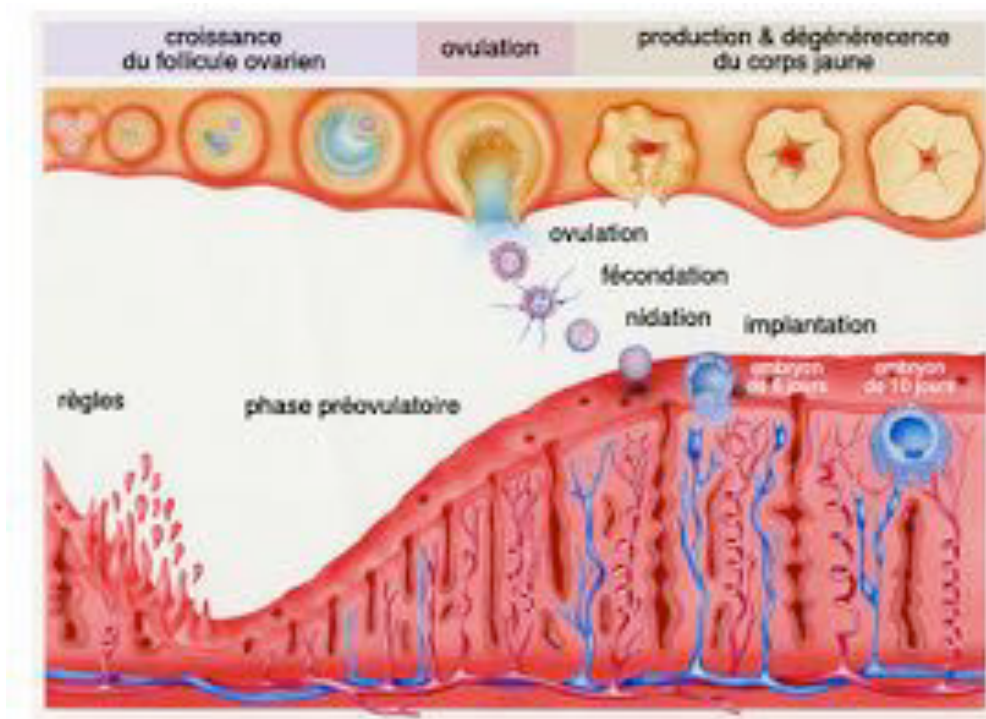


Figure 1: Le cycle menstruel et période de fécondité / régénération de l'endomètre. *d'après D. Pelletier*

L'utérus est sans doute l'organe qui subit les plus importantes modifications prolifératives et de remodelage chez les mammifères adultes. L'endomètre humain se régénère à partir de la couche basale, le compartiment inférieur précité qui persiste après la menstruation, pour donner naissance à la nouvelle couche fonctionnelle. L'endomètre encoure environ 400 cycles au cours de la vie reproductive d'une femme et, chaque mois, 4 à 10 mm de tissu muqueux se développe en 4 à 10 jours durant la phase folliculaire. Cette capacité de régénération des cellules de l'endomètre suggère la présence de cellules souches au sein de la couche basale, responsables de cette régénération cyclique [7]. L'idée que l'endomètre puisse contenir des cellules souches ou progénitrices a été ainsi proposée à plusieurs reprises au cours des trois dernières décennies [8-10]. Les données récentes attestent que l'endomètre humain contient un petit nombre de cellules souches capables de maintenir l'homéostasie tissulaire, par auto-renouvellement et différenciation multiple nécessaire à la reconstitution tissulaire. L'origine tissulaire de ces cellules souches reste cependant mal connue. Certaines études ont mis en évidence une origine extra-utérine potentielle de ces cellules souches, dérivées de la moelle osseuse, probablement recrutées dans l'utérus lors de chaque cycle menstruel. Ces mêmes cellules seraient responsables de la réparation de l'utérus au décours de l'accouchement. Une étude, portant sur des femmes en âge de procréer et traitées pour une leucémie par une transplantation de moelle osseuse après une irradiation corporelle totale et une chimiothérapie, a permis de mettre en évidence des cellules dérivées du donneur dans les deux compartiments, épithélial et stromal, de l'endomètre. Les cellules endométriales dérivées de la greffe représentaient 0,2 % à 48 % des cellules épithéliales et 0,3 % à 52 % des cellules stromales [11]. Chan et *al.* ont démontré à partir d'échantillons d'endomètre, prélevés sur des pièces d'hystérectomie de femmes en âge de procréer, que les populations de cellules épithéliales et stromales humaines d'endomètre étaient clonogéniques, c'est-à-dire capable d'établir un nouveau clone cellulaire [12] et ce, de façon indépendante du cycle menstruel ou

encore de l'activité menstruelle. Finalement, deux populations de cellules souches ont été identifiées dans l'endomètre : des cellules souches épithéliales / progénitrices (EPS) et des cellules souches mésenchymateuses (MSC). Ces deux types cellulaires ont une capacité d'auto-renouvellement *in vitro*, et peuvent se différencier en cellules matures et reconstituer les tissus *in vivo* [12-15]. Le remodelage physiologique et la régénération de l'endomètre humain seraient ainsi différents d'autres tissus adultes tels que les îlots pancréatiques et les tubules rénaux, maintenus par auto-réplication de cellules post-mitotiques différenciées [16, 17]. Ces cellules souches ou progénitrices de l'endomètre pourraient avoir aussi un rôle dans la pathogenèse des maladies de l'endomètre, telle que l'endométriose [18].

2.2 Leucocytes endométriaux

La muqueuse utérine contient des agrégats de cellules leucocytaires situées dans la couche basale de l'endomètre. En phase folliculaire du cycle menstruel, l'endomètre est peuplé principalement de cellules T (CD45+) et de rares cellules B (CD20+). Au sein de la couche fonctionnelle, quelques cellules Natural Killer (NK), des lymphocytes T et des macrophages sont localisés dans le stroma. Au cours de la phase sécrétoire, le nombre de cellules T et de macrophages varie très peu avec cependant une augmentation des macrophages en fin de cycle. En revanche, le nombre de cellules NK augmente considérablement au moment de l'ovulation et tout au long de la phase sécrétoire [19] (cf. ci-après). Ces cellules NK de l'endomètre sont les acteurs majeurs du processus de décidualisation qui s'initie avant l'implantation de l'embryon [20] et ont aussi un rôle clé dans le processus des menstruations.

2.3 La décidualisation

Au cours de l'évolution des mammifères, l'endomètre s'est développé pour une seule raison : implanter un embryon dans l'utérus. Chez les primates supérieurs, si l'ovocyte n'est pas fécondé, la couche fonctionnelle de l'endomètre est éliminée pendant les règles et le cycle menstruel commence de nouveau avec une nouvelle série de différenciation de l'endomètre. Le processus final (deuxième partie du cycle) de différenciation est appelé, comme cité précédemment, décidualisation. Le terme décidue est dérivé du verbe latin *decidere* qui signifie mourir, tomber ou se détacher. La décidualisation de l'endomètre ne se produit que chez les espèces où la placentation est invasive, c'est-à-dire qu'elle implique une brèche dans l'épithélium endométrial et l'invasion des tissus maternels par le trophoblaste. Ce processus désigne classiquement la transformation des fibroblastes du stroma endométrial en cellules sécrétrices spécialisées. Le tissu ainsi transformé fournit un support nutritif et « immuno-favorable » essentiel pour l'implantation de l'embryon et le développement placentaire [21].

La décidualisation de l'endomètre humain ne nécessite pas l'implantation d'embryon à la différence de la plupart des mammifères. Ce processus est initié par la hausse du taux de progestérone après l'ovulation. Bien que la transformation du stroma en soit la caractéristique la plus évidente, la décidualisation de l'endomètre concerne tous ses constituants. Cette transformation est un processus finement régulé impliquant la maturation des cellules souches/progénitrices épithéliales et stromales et associe : (i) une différenciation des fibroblastes et des cellules stromales endométriales en de grandes cellules polyploïdes (épithélioïdes-like), (ii) un profond remaniement de la composition et de l'organisation de la matrice extracellulaire (MEC) endométriale [22], (iii) un afflux massif de leucocytes (polynucléaires, macrophages et surtout cellules NK) [19, 23]. L'infiltration par les cellules NK fait partie intégrante de la transformation de l'endomètre au cours de la phase sécrétoire, sous le contrôle de la progestérone [20].

De profonds remaniements de la MEC accompagnent donc le processus de décidualisation [24]. Alors que les collagènes I, III et VI sont répartis de façon diffuse dans le stroma de l'endomètre au cours du cycle, les cellules stromales en voie de transformation synthétisent autour d'elles une membrane basale constituée d'un réseau de collagène de type IV, de laminine, de protéoglycanes, d'héparane-sulfate, d'entactine et de fibronectine [25, 26]. Cette modification de structure du tissu conjonctif est aussi associée à une réduction de la densité en collagènes fibrillaires. Elle a pour but de favoriser l'infiltration trophoblastique en anticipation d'une éventuelle implantation d'un embryon. Les études de l'ultrastructure de l'endomètre en voie de décidualisation ont révélé la formation de protubérances cytoplasmiques qui pénètrent dans le tissu conjonctif œdémateux, libérant, entre autre, des molécules de glycogène, entre autres, dans l'espace extracellulaire. Il a également été montré l'apparition de pinopodes ou protrusions apicales des cellules épithéliales de l'endomètre aux propriétés de pinocytose. Chez une femme normalement réglée, ces pinopodes apparaissent entre les jours 19 et 21 du cycle menstruel. Leur apparition est strictement réglée sous la dépendance de la progestérone [27, 28]. En fin de phase sécrétoire, les cellules stromales décidualisées présentent une activité phagocytaire intense qui contribue au remodelage de la MEC. Enfin, la mise en place de communications intercellulaires entre les cellules stromales est un évènement-clef de la décidualisation avec notamment la surexpression en phase sécrétoire de molécules d'adhésion, telle que la Cadherin-11, qui interviendra dans les interactions trophoblaste/décidue [29].

2.4 Régulation de la décidualisation

De nombreux facteurs hormonaux, paracrines et autocrines, régulent finement cette transformation déciduale, sans pour autant que son *primum movens* n'ait été clairement identifié.

Les stéroïdes ovariens contrôlent l'ensemble de la physiologie utérine. L'augmentation post ovulatoire de la progestérone permet la maturation de l'endomètre relayée par les estrogènes [30]. La présence au sein de l'endomètre d'enzymes impliqués dans la biosynthèse et le catabolisme des hormones stéroïdiennes permet une régulation locale de la concentration des stéroïdes ovariens qui n'est pas corrélée aux concentrations circulantes. Les rôles que pourraient avoir les gonadotrophines telles que la follicule stimulating hormone (FSH) et la luteinizing hormone (LH) sur l'initiation de la décidualisation restent controversés [31, 32]. Cependant, grâce à des modèles de culture de cellules stromales de l'endomètre, il apparaît de plus en plus évident que l'expression temporelle et spatiale de facteurs locaux induit une augmentation des taux cytoplasmiques d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), second messenger-clef dans la transformation cellulaire qui survient au moment de la décidualisation. Ainsi la relaxine [33], le cortisol releasing hormone (CRH) [34] et la prostaglandine E2 (PGE2) [35] ont des actions activatrices, alors que l'interféron gamma produit par les cellules leucocytaires de la couche basale de l'endomètre inhibe la synthèse de prolactine (PRL) induite par l'AMPc [36].

Les différents compartiments cellulaires tels que les cellules épithéliales, les cellules immunitaires locales et le système vasculaire peuvent générer des gradients de signaux supplémentaires, essentiels à la transformation du compartiment stromal. Ces médiateurs autocrines et paracrines telles que des interleukines (IL)-11, -1b et -15 ont des actions précises dans la cascade de transformations associées à la décidualisation. Ainsi, IL-11 est exprimée de

façon concomitante avec la PRL et IGFBP-1 ; l'inhibition de IL-11 est associée à une diminution de l'expression de ces marqueurs déciduaux [37]. IL-1b est un signal majeur qui favorise l'implantation et soutient la décidualisation. Cette cytokine favorise la synthèse d'intégrines et autres molécules d'adhésion de la MEC, régule la hausse de l'expression de la prostaglandin-endoperoxydase synthase 2 (PTGS2) impliquée dans la synthèse de prostaglandines et l'accumulation d'AMPc [38], améliore l'activité de la métalloprotéase matricielle (MMP)-3 et favorise la transformation morphologique des cellules stromales [39].

Des analyses faites sur des cultures primaires endométriales ont montré que IL-1b augmentait la synthèse de chémokines telle que CXCR1 aux propriétés mitogènes, favorisant l'angiogénèse [40, 41]. Récemment, l'IL-15 et la PRL ont été impliquées dans la prolifération et la différenciation des lymphocytes Natural Killer utérins ou déciduaux (dNK). Ces deux molécules sont produites par les cellules stromales de la muqueuse et leur expression est augmentée par la progestérone lors de la décidualisation [42, 43]. D'autres médiateurs sont impliqués dans ce processus de transformation de l'endomètre. Les molécules de la famille des transforming growth factor bêta (TGFb) (Activin, inhibin et follistatin, TGFb-1) ont un rôle majeur dans la régulation paracrine / autocrine du processus de décidualisation [44]. La voie de signalisation Notch, récepteur transmembranaire qui interagit avec DLL1, 3 et 4 ou Jagged (Jag-1 et -2) régule la prolifération, la différenciation et l'apoptose et le récepteur Notch-1 a un rôle modulateur dans la décidualisation [44]. La famille des CCN, composée de 6 protéines matricielles, pourrait, elle aussi, avoir un rôle dans le remodelage et la néoangiogénèse [45]. Enfin le système des endocannabinoïdes a une place prépondérante dans le processus de décidualisation [46].

Finalement, la décidualisation, qui commence en phase sécrétoire du cycle menstruel, a pour principale fonction de contrôler l'implantation du *conceptus*, de soutenir le

développement harmonieux de l'embryon et de ses annexes et de garantir l'intégrité de l'utérus au cours de la grossesse. Elle fournit le support physique au contrôle de l'invasion trophoblastique et au développement des annexes fœtales et délimite le contour de l'interface materno-fœtale.

3 INTERFACE MATERNO-FŒETALE

Dans l'espèce humaine, les interactions cellulaires materno-fœtales ont lieu au sein du placenta, de la décidue superficielle accolée aux membranes fœtales et dans les compartiments sanguins maternel et fœtal (figure2).

L'interface materno-fœtale entre la muqueuse utérine (l'endomètre décidualisé) et les tissus extra-embryonnaires du *conceptus* en développement est évolution constante au cours de la grossesse.

Au stade *morulla*, se produit la compaction qui permet l'acquisition de la polarité des blastomères et la différenciation de deux types de cellules embryonnaires : les cellules apolaires constitueront au centre de la morula, le bouton embryonnaire et les cellules polaires formeront autour du bouton embryonnaire, la couronne de trophoblaste. Les trophoblastes s'organisent en épithélium et seront à l'origine du futur placenta et des futures membranes fœtales.

La muqueuse utérine termine complètement sa transformation en cas de grossesse. Cette transformation déciduale est associée à une modification du comportement des cellules qui la composent avec des changements morphologiques et des modifications d'expression génique garantissant à la fois le support de l'invasion trophoblastique et surtout son contrôle.

Environ une semaine après la fécondation, les trophoblastes du trophoctoderme établissent un dialogue complexe avec les cellules maternelles permettant l'implantation de l'embryon dans l'endomètre décidualisé et réceptif. L'embryon humain est rapidement séquestré à l'intérieur de la paroi utérine. En raison de l'importance et de la complexité de la littérature et du fait que le sujet est en dehors du domaine de ces travaux, le phénomène d'implantation ne sera pas développé plus avant.

3.1 Le placenta

Le placenta humain est un organe éphémère qui assure les fonctions de nutrition, d'oxygénation, d'épuration et de détoxification du fœtus. Ces fonctions reposent sur les échanges entre les circulations sanguines fœtale et maternelle qui, en situation normale, n'entrent jamais en contact l'une avec l'autre. Dans l'espèce humaine, la placentation est invasive et suppose un contrôle de la pénétration du *conceptus*. Elle commence par l'implantation de l'embryon dans la muqueuse utérine, phase où s'établissent les premiers contacts entre deux types cellulaires immunologiquement différents.

Le trophoctoderme embryonnaire se différencie alors en une assise cellulaire interne, le cytotrophoblaste, et une assise cellulaire externe, le syncytiotrophoblaste. Ces différents types cellulaires vont s'organiser pour assurer la pénétration de l'embryon et la mise en place de la zone d'échange fœto-maternelle. Ils vont permettre la formation de la villosité choriale qui représente l'unité structurale et fonctionnelle du placenta humain.

La villosité est formée par un axe mésenchymateux formé de fibroblastes et de macrophages (cellules fœtales de Hofbauer) d'origine embryonnaire, dans lequel se développent les vaisseaux fœtaux, bordé par les trophoblastes. Cette villosité peut être libre ou ancrée à la décidue (villosité crampon). Au sein de la villosité placentaire, les cellules trophoblastiques se différencient en deux voies : le trophoblaste villositaire et le trophoblaste extravillositaire.

Le trophoblaste villositaire forme une couche de cellules mononucléées prolifératives qui se différencient par fusion cellulaire en syncytiotrophoblaste, constamment régénéré. C'est un tissu fragile qui est directement en contact du sang maternel. Il est le siège de toutes les fonctions d'échange fœto-maternel.

Les trophoblastes extravilloux, au contact de la décidue, assurent l'ancrage du placenta. Ces trophoblastes sont dotés d'un potentiel invasif qui leur permet de pénétrer dans la paroi utérine (endomètre et myomètre). D'une part, ces trophoblastes extravilloux colonisent les artères spiralées de l'utérus ; ces cellules pénètrent dans la décidue, forment le trophoblaste interstitiel, encerclent les artères utérines, détruisent la média artérielle qui est remplacée par un tissu fibrinoïde.

Les cellules trophoblastiques endo-vasculaires migrent vers la lumière de l'artère et remplacent les cellules endothéliales. Cette restructuration des artères maternelles, qui deviennent insensibles aux facteurs angiotensifs, a pour but de faciliter le flux sanguin vers la chambre intervillouse, garant du développement harmonieux du fœtus. D'autre part, des cellules trophoblastiques se déplacent dans le myomètre interne où elles fusionnent pour former des cellules géantes. Cette invasion contrôlée de cellules fœtales jusqu'au premier tiers du myomètre et la transformation artérielle mettant en contact étroit des cellules allogéniques est le fruit d'une symbiose entre les types cellulaires qui réalisent un compromis immunologique : il n'y a ni rejet maternel, ni invasion excessive. D'ailleurs, en cas de grossesse ectopique ou d'implantation sur du tissu cicatriciel, l'absence de décidue empêche le contrôle de l'invasion trophoblastique et peut conduire à la rupture tubaire d'une grossesse ectopique, ou au développement d'une placentation invasive pathologique.

Au sein du placenta, les arbres villositaires s'épandent dans la chambre intervillouse placentaire où arrive le sang maternel par les artères spiralées de l'utérus. Le placenta permettra des échanges de type hémochorial (une seule couche de cellules fœtales sépare le sang de la mère et du fœtus) : le sang maternel vient directement au contact des villosités choriales (figure 2). Au terme de la grossesse, la surface d'échange, et donc de contact entre le sang maternel et les villosités placentaires, est de l'ordre de 12 m^2 [47].

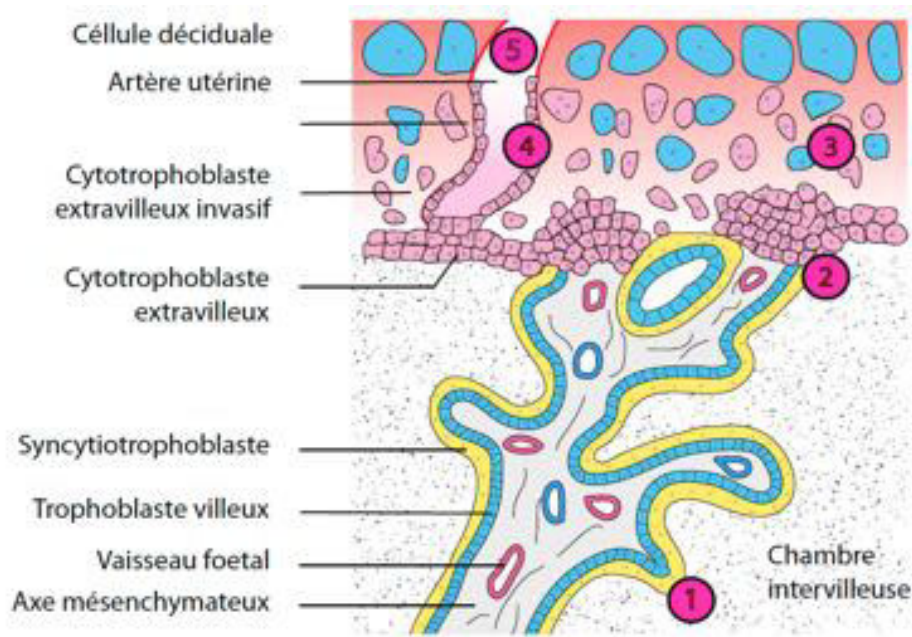


Figure 2 : Structure de l'interface materno-fœtale humaine. Les villosités chorales correspondent à la zone d'échange entre le sang maternel et le sang fœtal. Les différentes zones de contact materno-fœtal sont : 1- le syncytiotrophoblaste qui recouvre les villosités et baignant dans le sang maternel ; 2- villosité crampon composé de cytotrophoblaste extravilleux; 3- le cytotrophoblaste qui s'est implanté dans la paroi des artères maternelles ; 4- le cytotrophoblaste extravilleux dans la décidue maternelle ; 5- les débris villositaires déversés dans le sang maternel, *d'après Evain-Brion D. 2010 [47]*.

3.2 Les membranes fœtales

La structure membraneuse qui entoure le fœtus en développement et qui forme la cavité amniotique est un tissu d'origine fœtal, génétiquement différent de la mère, et composé de deux feuillets distincts histologiquement : l'amnios (couche interne) et le chorion (couche externe). L'amnios est une structure translucide au contact du liquide amniotique qui borde la cavité amniotique. Le chorion est une membrane plus opaque qui borde la face extérieure de l'amnios et le sépare de la décidue et de l'utérus maternel. L'amnios et le chorion sont initialement séparés par une cavité, le cœlome extraembryonnaire. La structure des

membranes est définitive au quatrième mois de grossesse où les deux feuillets, l'amnios et le chorion, sont accolés. A terme, les membranes fœtales humaines ont une surface d'environ 1 500 cm² pour une épaisseur de 200 à 300 µm. Trente pour cent de cette surface recouvre le placenta et 70% interagissent avec la décidue maternelle et représentent les membranes réfléchies [48].

3.3 Anatomie descriptive des membranes fœtales

Les membranes fœtales sont avasculaires et dépourvues de toute fibre nerveuse (Figure 3). La MEC est formée des protéines synthétisées par plusieurs types de cellules de l'amnios et du chorion et confère aux membranes fœtales à la fois la résistance et l'élasticité requise pour supporter l'expansion de la cavité amniotique, la croissance du fœtus et ses mouvements [49].

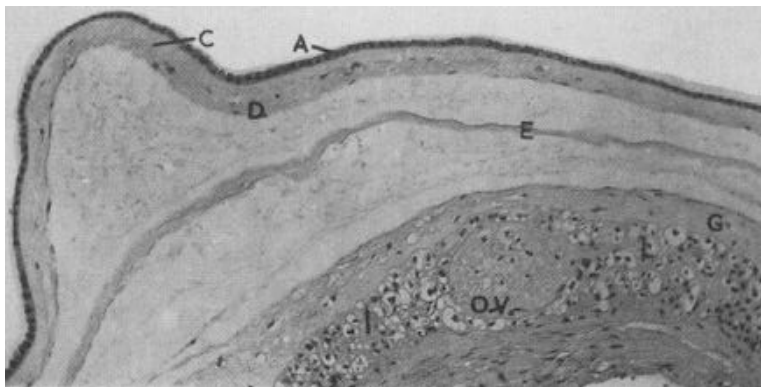


Figure 3 : Coupe histologique des membranes fœtales avec amnios et chorion : épithélium amniotique (A), couche compacte (C), couche fibroblastique (D), couche spongieuse (E), couche réticulée (G) trophoblaste (I), villosité atrophiée (OV), d'après *GL Bourne 1960* [50]

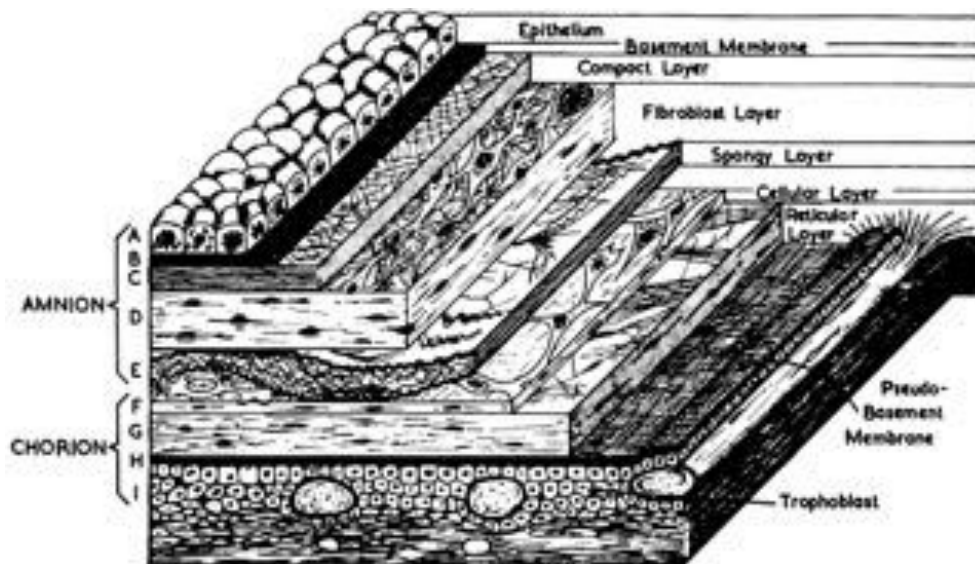


Figure 4 : Diagramme illustrant les différentes couches de l'amnios réfléchi et du chorion d'après *GL Bourne 1960*, [50]

L'amnios est la membrane interne au contact du liquide amniotique. Cette membrane ne correspond pas à une simple couche cellulaire mais possède une structure complexe. Elle mesure 0,2 à 5 mm d'épaisseur et comprend 5 couches : l'épithélium amniotique, la membrane basale, la couche compacte, la couche fibroblastique et la couche spongieuse. L'épithélium est unistratifié cubique dont l'apex forme des microvillosités lui donnant un aspect de bordure en brosse au contact du liquide amniotique. La cellule épithéliale amniotique, riche en canaux transmembranaires, communique largement avec l'espace extracellulaire. La membrane basale des cellules amniotiques lance des projections de membranes plasmiques qui s'entremêlent avec la lame basale, composée d'un réseau de fibres réticulées, afin d'augmenter la surface d'échange. La couche compacte est acellulaire et composée principalement de collagène fibrillaire de type I et III, organisé en un réseau formant un maillage en treillis, à l'origine de la force élastique limite des membranes. Ce treillis lui permet à la fois de s'allonger et de s'affiner, ou de s'épandre avec une certaine

limite intrinsèque [51]. Cette couche compacte repose sur la couche fibroblastique, amorphe, elle-même au contact de la couche spongieuse. La couche spongieuse provient du cœlome extraembryonnaire contient principalement du collagène de type III et est organisée en un maillage lâche, riche en protéoglycanes hydratés organisé en réseau. La présence des molécules d'eau au sein de la structure souple de ce réseau lui garantit une déformation élastique et permet d'absorber les chocs. Ce réseau permet au feuillet amniotique, rendu semi-rigide par son feuillet compact, à glisser sur le chorion lui même fixé par la décidue au myomètre adjacent [50].

Le chorion, plus externe, repose sur la décidue maternelle. Le feuillet chorionique est composé de quatre couches comprenant une couche cellulaire, la couche réticulée issue du mésoderme chorionique, une pseudomembrane et un épithélium chorionique plusstratifié qui comprend des cellules trophoblastiques, apparentées aux trophoblastes placentaires [50]. Ces trophoblastes sont en fait des cytotrophoblastes extravilleux qui se sont différenciés au moment de la régression du chorion vilieux lors des premières étapes de la placentation. Les cellules trophoblastiques les plus proches de la lame basale adhèrent fortement les unes aux autres. Plus avant dans la décidue maternelle, les trophoblastes sont plus disséminés dans une MEC dense et des villosités dégénérées peuvent y être observées. L'amnios et le chorion sont séparés par une zone intermédiaire, la couche spongieuse constituée d'un réseau fibrillaire fin et dispersé.

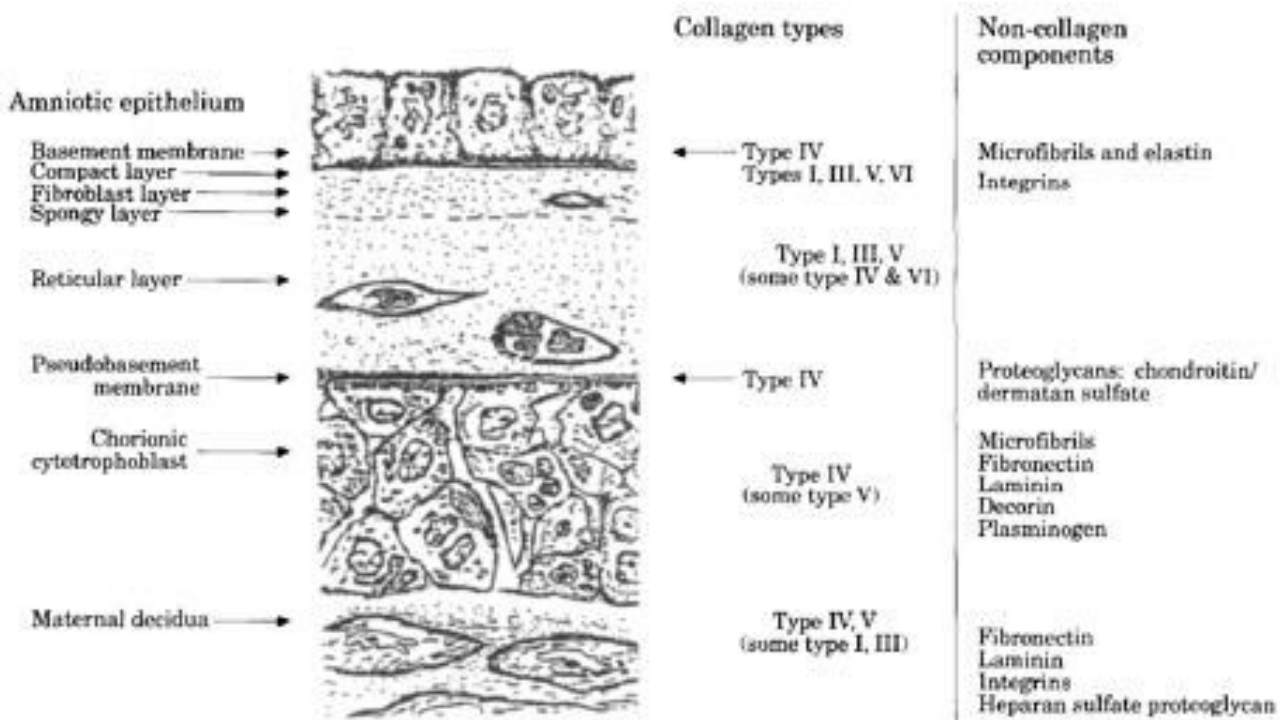


Figure 5 : Distribution des composants de la matrice extracellulaire dans l'amnios, le chorion et la décidue, d'après G. D. Bryant-Greenwood [49].

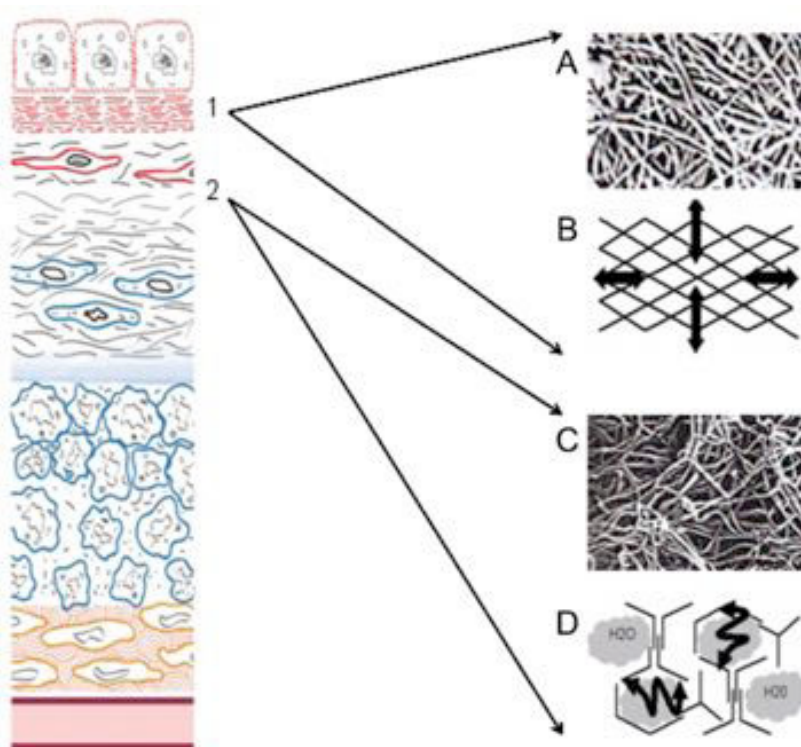


Figure 6 : Organisation tridimensionnelle des collagènes des couches compacte et spongieuse. (1) Dans la couche compacte, le collagène est principalement du collagène de type III fibrillaire, organisé strictement en un réseau formant un maillage en treillis, à l'origine de la force élastique limite des membranes. (2) Dans la couche spongieuse, le collagène, principalement de type III, est organisé en un réseau lâche hydraté, qui autorise une déformation élastique. (A) Micrographie électronique de la couche compacte, adaptée de [52]. (B) Représentation schématique du réseau en treillis. (C) Micrographie électronique de la couche spongieuse, adaptée de [52]. (D) Représentation schématique du réseau lâche. D'après C. Méhats [48]

3.4 Les cellules fœtales circulantes

Des études menées sur des échantillons de sang de femmes enceintes indiquent que des cellules fœtales passent dans la circulation maternelle, à raison d'environ une cellule par millilitre de sang. D'autre part, au niveau des villosités placentaires, les remaniements de la MEC et la lyse cellulaire conduisent inévitablement à la libération dans la circulation maternelle de débris d'origine trophoblastique qui présentent alors des antigènes fœtaux sensibilisant et éduquant le système immunitaire maternel. Nous ne développerons pas plus longuement cette « source » d'interactions materno-fœtales pour nous concentrer sur l'interface *in utero*.

4 QUAND L'ENDOMETRE EST MALADE : L'ENDOMETRIOSE

4.1 Définition et généralité sur l'endométriose

L'endométriose est une maladie gynécologique bénigne, inflammatoire, chronique, hormono-dépendante, définie par la présence d'endomètre fonctionnel en dehors de la cavité utérine. C'est une pathologie fréquente qui affecterait plus de 10 % des femmes en âge de procréer et qui est retrouvée chez près de 40 % des femmes qui souffrent de douleurs pelviennes chroniques. Dans la littérature, ces estimations sont variables d'une étude à l'autre selon le mode de diagnostic, allant de 2 à 82 % [53-55]. Dans la population des femmes enceintes, la prévalence de l'endométriose n'est pas connue.

Les lésions d'endométriose sont hétérogènes et la maladie présente différents phénotypes définis par la nature et la localisation des lésions. Cette hétérogénéité, à la fois clinique et anatomique, est une des caractéristiques principales de la maladie. Les lésions peuvent être superficielles isolées constituées d'implants adhérents à la surface du péritoine (implants péritonéaux), ovariennes (l'endométriome ovarien est un kyste ovarien endométriosique à paroi épaisse et à contenu hématique) ou profondes (arbitrairement définies par une pénétration de la lésion d'au moins 5 mm sous la surface péritonéale, ou plus récemment qui infiltreraient la couche musculuse vésicale, vaginale ou rectale) [56]. Les lésions profondes peuvent affecter les ligaments utéro-sacrés, la cloison rectovaginale, le rectum, la vessie et les uretères [57].

L'adénomyose est un type d'endométriose interne définie par la présence de glandes endométriales développées à l'intérieur du myomètre [58].

La prise en charge des femmes atteintes d'endométriose doit avoir lieu au sein d'équipes multidisciplinaires dans des centres de référence [59-61] et doit tenir compte des symptômes cliniques, du caractère multifocal des lésions, de l'hétérogénéité de la maladie et d'une éventuelle infertilité associée. Le traitement de l'endométriose peut associer des traitements médicaux, chirurgicaux et d'assistance médicale à la procréation.

Des traitements médicaux hormonaux et non hormonaux sont efficaces sur les douleurs [62]. En dehors du traitement antalgique (anti-inflammatoires non stéroïdiens et dérivés morphiniques), le traitement médical de l'endométriose est hormonal à visée anti-gonadotrope et fondé sur le blocage de la fonction ovarienne. Plusieurs classes thérapeutiques telles que la pilule œstro-progestative, les progestatifs et les analogues de la GnRH sont disponibles, avec une efficacité relative équivalente [61, 63, 64]. Ce traitement est symptomatique et l'effet n'est que suspensif et transitoire, avec une récurrence de la symptomatologie douloureuse après 6 mois de traitement chez plus de la moitié des patientes [64]. Dans certains cas, le recours à un traitement chirurgical de l'endométriose est nécessaire pour être efficace sur les douleurs ou la fertilité. Il correspond à une chirurgie extensive comparable à la chirurgie carcinologique, reposant sur l'exérèse complète de toutes les lésions d'endométriose [65, 66] dont le but est la disparition des douleurs [65-67], une amélioration de la fertilité [68] et une diminution du risque de récurrence [69-72]. Cette chirurgie peut conduire à des résections étendues pouvant concerner les ligaments pelviens, le vagin, l'appareil urologique et digestif et parfois des nerfs pelviens [65]. Chez les femmes jeunes ayant un désir de grossesse, la radicalité de l'exérèse a pour objectif de conserver une fécondité future [60] mais expose les femmes à des complications potentiellement invalidantes [65, 66].

4.2 Physiopathologie de l'endométriose

La lésion d'endométriose ou endomètre ectopique se distingue par rapport à l'endomètre eutopique *i.e.* la muqueuse de la cavité utérine. Le tissu ectopique, composé de l'épithélium endométrial et de son stroma, est hormono-dépendant et répond aux mêmes variations cycliques que l'endomètre eutopique. Lors du cycle menstruel, le remaniement ischémique de la couche fonctionnelle de l'endomètre entraîne alors une nécrose des glandes, du chorion et des vaisseaux, responsable de la menstruation. Ce remaniement concerne également l'endomètre ectopique, à l'origine de saignements. Si la maladie peut être totalement asymptomatique [60], ces remaniements endométraux sont responsable, de façon simplifiée, d'une inflammation chronique à l'origine des douleurs et de l'infertilité [60].

Plusieurs théories sont proposées pour expliquer la présence de tissu endométrial en dehors de la cavité utérine :

- i) La théorie de la métaplasie suggère que l'épithélium ovarien et tous les tissus ayant une origine embryologique commune issue du mésoderme peuvent se transformer en un tissu de type endomètre (métaplasie endométrioïde) sous l'influence d'un stimulus inducteur inconnu, mais qui pourrait être de nature hormonale ou inflammatoire. La présence de localisations de lésion endométriosiques atypiques notamment décrites chez des hommes sous hormonothérapie au long court [73-76] ou la présence de lésions endométriosiques chez des femmes ayant une absence d'endomètre [77] ou ayant un syndrome de Rokitansky-Kuster-Hauser [78], un syndrome de Turner [79, 80], [81] ou une aménorrhée hypothalamique [82] plaide pour une transformation métaplasique.
- ii) La théorie de l'induction, phénomène décrit en embryologie [83, 84], correspond à la transformation d'un tissu sous l'influence d'un tissu adjacent à l'aide de la diffusion d'une substance capable de stimuler ou d'induire une différenciation de type épithéliale

(épithélium cœlomique). L'hypothèse est que des facteurs biochimiques endogènes libérés par les cellules endométriales issues du reflux peuvent stimuler la différenciation des cellules péritonéales indifférenciées (mésenchyme) vers un tissu endométriosique (métaplasie endométrioïde).

- iii) La théorie des emboles vasculaires et/ou lymphatiques est fondée sur l'existence connue d'une extension par voie lymphatique ou hématogène du tissu endométrial au sein du myomètre, suggérant qu'il puisse exister une dissémination par voie hématogène ou lymphatique supposant l'existence de métastases endométriosiques [85-91].
- iv) La théorie de l'implantation [92], qui est la plus communément acceptée, est une théorie selon laquelle les lésions endométriosiques résultent de la régurgitation de tissus endométriaux présents dans le sang menstruel par les trompes de Fallope dans la cavité abdomino-pelvienne. Cette menstruation rétrograde est un phénomène quasiment ubiquitaire chez les femmes. En effet, au moment des règles, du sang peut passer par les trompes et parvenir à la cavité abdominale, transportant avec lui des fragments d'endomètre capables de générer de nouveaux foyers d'endométriose [56]. Toutefois, la différence entre la prévalence de l'endométriose et les menstruations rétrogrades quasi-systématiques des femmes suggère une susceptibilité individuelle pour cette maladie. Des processus tels que l'adhésion cellulaire, la prolifération et les processus d'invasions locales seraient dérégulés et faciliteraient l'implantation et la survie des fragments de l'endomètre en dehors de la cavité utérine sous le contrôle des hormones stéroïdes et de l'inflammation [59].
- v) Enfin la présence de cellules souches endométriales au sein des couches basales de l'endomètre eutopique [93, 94] suggère que des implants d'endométriose pourraient être issus de la menstruation rétrograde de ces cellules souches/progénitrices endométriales. A nouveau, la description de lésions cliniques d'endométriose chez des patientes

dépourvues d'endomètre fonctionnel, comme les personnes atteintes du syndrome de Rokitansky-Kuster-Hauser [78] ainsi que chez les hommes avec un cancer de la prostate traités par estrogène à haute dose [74] sont en faveur d'une origine non endométriale de l'endométriose. En effet, il a été supposé que les cellules souches/progénitrices extra-utérines provenant de la moelle osseuse comme les cellules souches progénitrices mésenchymateuses et les progéniteurs endothéliaux pourraient se différencier en cellules endométriosiques [93, 95].

L'hypothèse d'une dissémination péritonéale par le reflux tubaire selon la théorie largement acceptée de Sampson renforce logiquement l'idée qu'une lésion superficielle puisse générer une lésion plus profonde [96]. Si les phénotypes de la maladie sont certainement liés à l'exposition de la menstruation rétrograde, ils sont également en lien étroit avec l'altération des cellules de l'endomètre et les variations spécifiques du milieu hormonal. Ce qui reste inconnu est de savoir si les lésions partagent la même pathogenèse ou sont tributaires de phénomènes physiopathologiques spécifiques [97]. L'impact global des lésions ectopiques est caractérisé par leurs propriétés intrinsèques résultant du processus de saignements cycliques, de phénomène de métaplasie, de néovascularisation, de néoneurogénèse et de fibrose. La multifactorialité de la maladie laisse suggérer l'effet d'un environnement hormonal modifié [98], de processus inflammatoires [99, 100], d'une évasion au système immunitaire et d'un endomètre aux propriétés modifiées. Ces modifications impliqueraient les propriétés de prolifération, d'attachement et d'invasion [59], ainsi qu'une régulation du stress oxydatif [101]. Ceci peut contribuer à générer soit des douleurs, soit une infertilité ou les deux avec une sévérité variable.

4.3 Grossesse chez les femmes atteintes d'endométriose

4.3.1 Retentissement de la grossesse sur l'endométriose

Les connaissances de l'influence de la grossesse sur l'endométriose sont limitées et confuses. Il est communément admis que l'endométriose est améliorée pendant la grossesse. Beecham en 1949 considérait que « *la nature avait mis au point une mesure prophylactique et curative de l'endométriose : i.e. la grossesse* » et que la grossesse était « *le meilleur traitement de l'endométriose* » [102]. L'effet de la grossesse sur l'endométriose a été traité dès 1965 par McArthur et Ulfelder qui montraient que la grossesse était accompagnée, bien que de façon variable, d'une modification de la taille des lésions à l'examen clinique avec une tendance à l'extension au cours du premier trimestre et à la contraction au cours du dernier trimestre de la grossesse et pendant le post-partum [103]. L'étude de modèles de singes a montré, pendant la grossesse, une régression complète des lésions dans les formes minimales et partielle dans les formes modérées [104]. Il a été montré que survenait une disparition de la symptomatologie douloureuse associée à une modification de l'aspect échographique de lésions profondes en cours de grossesse de femmes atteintes d'une endométriose profonde sévère non opérée [105] et que les lésions d'endométriose des femmes enceintes paraissaient moins fibreuses et non pigmentées en coelioscopie [106]. Sur 24 cas d'endométrioses analysés, la moitié avait une diminution ou une disparition de la lésion au cours de la grossesse, et un quart avait une augmentation de la taille dont trois cas de transformation des lésions [107]. Il existe également un nombre substantiel de publications de cas cliniques qui relatent la survenue de complications telles que l'hémopéritoine [108-120], la rupture urétérale ou vésicale [121], des perforations digestives [122-133] et des fistules en cours de grossesse pouvant être les conséquences de modifications de la nature même de la lésion pendant la grossesse. Les changements des lésions pendant la grossesse peuvent également mimer une transformation maligne des lésions [134, 135].

La physiopathologie de la survenue de ces complications n'est pas claire. Plusieurs explications sont possibles incluant les modifications de vascularisation de la lésion, le caractère localement invasif de la lésion d'endométriose et l'inflammation chronique qu'induit l'endométriose [118]. La croissance de l'utérus avec l'avancement de la grossesse peut être responsable de la mise en traction de ces adhérences et favoriser la survenue de complications. Enfin, ces complications semblent potentiellement être liées à des transformations des implants ectopiques pendant la grossesse, par ce phénomène de transformation déciduale ou *deciduosis*.

Cette question a été traitée par Geoffroy Canlorbe dans une revue systématique et exhaustive en 2012 qui recensait 52 publications (255 cas) retrouvées dans la littérature, décrivant des lésions d'ectopie déciduale chez des femmes enceintes ou au cours des premières semaines du post-partum [136]. La déciduose ectopique de la grossesse correspond à la présence de tissu décidual hors de l'utérus. Considérée comme une entité anatomopathologique propre, la physiopathologie est mal comprise. Il est supposé que ces lésions observées pendant la grossesse puissent être issues soit d'une métaplasie déciduale liée à la totipotence des cellules du mésenchyme sub-cœlomique [137], soit à une diffusion lymphatique de cellules provenant de l'endomètre. Cependant en nous fondant sur les similitudes de localisation entre les lésions endométriosiques et les ectopies déciduales, il paraît séduisant de penser que la déciduose puisse s'agir d'une transformation déciduale des lésions endométriosiques au cours de la grossesse [118].

4.3.2 Retentissement de l'endométriose sur le déroulement de la grossesse

Les études du risque de complications de la grossesse chez les femmes atteintes d'endométriose ont montré de façon hétérogène un risque augmenté de prématurité, de petit poids de naissance, de saignement anténatal, de complications placentaires, de pré-éclampsie

et de césarienne [138-144]. Si la plupart de ces études semblait montrer une majoration du risque obstétrical, leur caractère rétrospectif, leurs effectifs réduits et l'absence fréquente de groupe témoin rendent leur interprétation délicate. Dans certaines études étaient incluses des femmes pour qui le diagnostic de certitude n'était pas disponible et les femmes qui ont conçu par fécondation in vitro / transfert d'embryons n'étaient pas toujours identifiées. Cette hétérogénéité des résultats de la littérature tient également au fait que beaucoup n'ont pas pris en compte le caractère hétérogène de la maladie endométriosique et n'ont pas eu recours à un groupe témoin approprié. Il est ainsi indispensable de tenir compte des différents phénotypes d'atteinte et de disposer d'un groupe témoin correctement constitué pour envisager l'étude de l'impact de l'endométriose sur la grossesse.

Des études morphologiques récentes, ainsi que des études fondamentales ont démontré qu'en cas d'endométriose, l'endomètre eutopique ainsi que le myomètre interne présentent des anomalies fonctionnelles et structurelles avec des caractéristiques histologiques et moléculaires différentes de celui des femmes non atteintes [145-148]. Ainsi, il a été montré une dérégulation de l'expression des gènes dans l'endomètre eutopique de femmes atteintes d'endométriose [149-153]. L'hypothèse est que le tissu endométrial intrinsèquement anormal prédispose à des lésions sur des sites ectopiques. Les altérations dans les voies moléculaires de l'endomètre eutopique lors de l'implantation sont susceptibles de contribuer à l'infertilité ou à des complications de la grossesse chez ces femmes.

Plusieurs mécanismes physiopathologiques suggèrent que l'endométriose pourrait avoir des conséquences sur le déroulement normal de la grossesse, incluant des processus inflammatoires, immunologiques, endocriniens et vasculaires. L'altération de l'endomètre au cours de l'endométriose pourrait perturber la décidualisation, impacter la mise en place des

annexes fœtales en début de grossesse, altérer le fonctionnement placentaire et être en lien avec des anomalies de la croissance fœtale ou des pathologies hypertensives gestationnelles.

Des données moléculaires qui tendent à émerger indiquent que les réponses de l'utérus à des signaux hormonaux diffèrent profondément entre les patientes souffrant d'endométriose et des témoins sains. En d'autres termes, l'endométriose pourrait constituer un modèle informatif aidant à appréhender comment « un milieu utérin » défavorable au moment de l'implantation peut aboutir plus tard dans la grossesse à la survenue de complications obstétricales [119]. Ces modifications interféreraient avec le contrôle du déroulement normal de la grossesse et fourniraient une explication biologique plausible aux liens qui existeraient entre l'endométriose pelvienne, les échecs d'implantation et les issues défavorables de la grossesse.

Le comportement de l'endomètre malade dans un milieu saturé en stéroïdes au cours de la grossesse mérite une attention particulière. L'endométriose est une pathologie estrogène-dépendante, en rapport avec une résistance locale à l'action de la progestérone dans l'endomètre [119, 154]. La résistance périphérique à la progestérone est un concept qui se réfère à l'observation selon laquelle il existe une variation d'expression d'un sous-ensemble de gènes dérégulés dans l'endomètre sécrétoire de femmes atteintes d'endométriose, incluant l'expression du gène de l'isoforme PR-B [155] celui de la 17 β -hydroxystéroïde-déshydrogénase-2 [156], la glycodeline [151] ou encore les gènes Hoxa-10 et Hoxa-11 [152, 157]. Des modifications épigénétiques modulées par des signaux pro-inflammatoires contribueraient à la perturbation de l'action de récepteurs nucléaires [158]. Munro *et al.* ont montré que l'acétylation globale des histones variait au cours du cycle menstruel [159].

Les médiateurs de l'inflammation ont un rôle essentiel dans les grandes fonctions de la reproduction féminine incluant l'ovulation, la menstruation, l'implantation, et les mécanismes de la parturition [160]. La présence de tissu endométrial en dehors de la cavité utérine

induirait une activation immunitaire et un état hyper-inflammatoire responsable d'une perturbation de l'endomètre endo-utérin. Ces perturbations pourraient avoir un effet sur le contrôle de la décidualisation et de la formation des annexes fœtales en cours de grossesse [154, 161]. De plus, l'accouchement prématuré et la rupture prématurée des membranes sont des événements en lien avec une activation de l'inflammation cf. ci-après [138]. Un état inflammatoire chronique de l'utérus lié à l'endométriose pose la question de la qualité des annexes fœtales et l'intégrité de l'interface fœto-maternelle en regard du devenir de la grossesse.

5 LA PARTURITION HUMAINE

La parturition humaine est l'association de trois événements synchronisés incluant la maturation du col (dilatation et effacement), les contractions du myomètre et la rupture des membranes fœtales qui concourent à la naissance du fœtus à terme. Elle se caractérise par des événements anatomiques, physiologiques, biochimiques, endocriniens et immunologiques qui surviennent chez le fœtus et chez la mère. Cependant, dans l'espèce humaine, les mécanismes qui participent à l'initiation de la parturition, et de la rupture des membranes fœtales en particulier, demeurent mal compris [1, 2].

5.1 La contraction utérine

Les contractions utérines surviennent au cours du cycle menstruel et pendant la grossesse. Elles sont caractérisées par une fréquence, une amplitude, une durée et une direction de propagation. Elles dépendent de l'activité contractile des cellules musculaires lisses (myocytes utérins) qui composent la majeure partie du myomètre. En dehors de la grossesse, au cours du cycle menstruel, des contractions appelées aussi vagues myométriales, sont observées et impliquées dans les menstruations et l'implantation de l'embryon [162, 163]. L'activité contractile de l'utérus non gravide semble être fondamentalement différente de celle de l'utérus gravide.

Au cours de la grossesse, le myomètre reste relativement quiescent en dépit de la distension induite par la croissance du fœtus et du volume amniotique. En réalité, le myomètre n'est jamais totalement quiescent pendant la grossesse et serait plutôt le siège de contractions de longue amplitude et de longue durée, focalisées, et non perçues ou non douloureuses, sans conséquence sur l'intégrité du col. En revanche, à terme, se produit une transition vers de véritables contractions de travail synchronisées, rythmiques et puissantes, de

grande amplitude, qui contribuent à la dilatation du col et génèrent les forces nécessaires à l'expulsion du fœtus hors de l'utérus à travers le bassin maternel alors que l'utérus humain ne dispose pas de stimulateur ou d'innervation motrice. Cette transition utérine d'un état « pseudo »-quiescent vers un état activé est liée à une inversion progressive des phénomènes inhibiteurs au profit de ceux activateurs des contractions du myomètre. Plusieurs événements sont nécessaires à l'obtention de contractions synchrones requises pour le travail obstétrical avec notamment les changements morphologiques et biochimiques de l'utérus lui conférant une sensibilisation progressive aux facteurs stimulants.

Ainsi, les *gaps junctions* ou jonctions communicantes entre les myocytes [164] sont des structures protéiques complexes perméables aux ions et petites molécules qui assurent le couplage électrique, ionique et moléculaire entre les cellules musculaires ce qui favorise la coordination et la propagation de la contraction synchronisée à toutes les fibres musculaires de l'utérus. A la différence de ce qui est observé dans les modèles murins, l'apparition des *gap junctions* est graduelle au cours de la gestation humaine et l'expression de la connexine 43, la protéine des *gap junctions* la plus abondante dans le myomètre, est estrogène-dépendante et également sous l'influence des prostaglandines.

En fin de grossesse, l'augmentation du récepteur à PGF2alpha et celle d'agonistes contractiles telles que les prostaglandines PGE2 et PGF2alpha participent à l'augmentation de l'excitabilité des myocytes. L'expression de récepteurs à l'ocytocine [165] qui est également stéroïdo-dépendante s'accroît en fin de grossesse et au moment du travail obstétrical [166]. Une diminution de la réceptivité myométriale aux catécholamines est observée avec une baisse de la concentration en récepteurs β 1-adrenergiques [167] et β 2-adrenergiques [168], ainsi responsable d'une baisse de la production d'AMPc, messenger intracellulaire de la relaxation myométriale.

Le cytoplasme du myocyte contient l'ensemble de la machine contractile composée de filaments épais (myosine), minces (actine) et intermédiaires (desmine et vimentine). Des structures riches en molécules d'actines fixées à la face interne de la membrane plasmique, les bandes denses, servent de point d'ancrage aux filaments d'actine et aux filaments intermédiaires et contribuent au cytosquelette de la cellule. Le réseau que forme la combinaison de ces éléments cytoplasmiques confère aux fibres musculaires lisses une force de transduction permettant leur rétraction selon un axe longitudinal. La liaison entre deux bandes denses de membranes plasmiques de cellules voisines garantit un couplage mécanique entre les deux cellules. Très brièvement, au niveau cellulaire, la dépolarisation de la membrane plasmique initie l'entrée d'ions calcium (Ca^{2+}) dans les cellules à travers les canaux Ca^{2+} voltage-dépendant, d'une part, et contribue à l'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} . D'autre part, les agonistes procontractiles liés à leurs récepteurs membranaires peuvent provoquer l'ouverture d'un canal calcique via l'activation de la phospholipase C (PLC) et la formation d'inositol triphosphate (IP3) qui provoque la libération du Ca^{2+} stocké dans le réticulum sarcoplasmique. Cette augmentation intracellulaire du Ca^{2+} permet la liaison de Ca^{2+} à la calmoduline, protéine intracellulaire qui active une kinase qui phosphoryle la chaîne légère de la myosine. Cette phosphorylation permet l'établissement de ponts transversaux entre les filaments d'actine et la myosine à l'origine de la contraction musculaire. Les contractions synchrones se produisent dans une région de l'utérus et la mise en tension de la paroi provoque une dépolarisation d'autres myocytes permettant une extension de proche en proche à l'origine d'une activité synchrone qui s'étend et se généralise progressivement à tout le myomètre (figure 8).

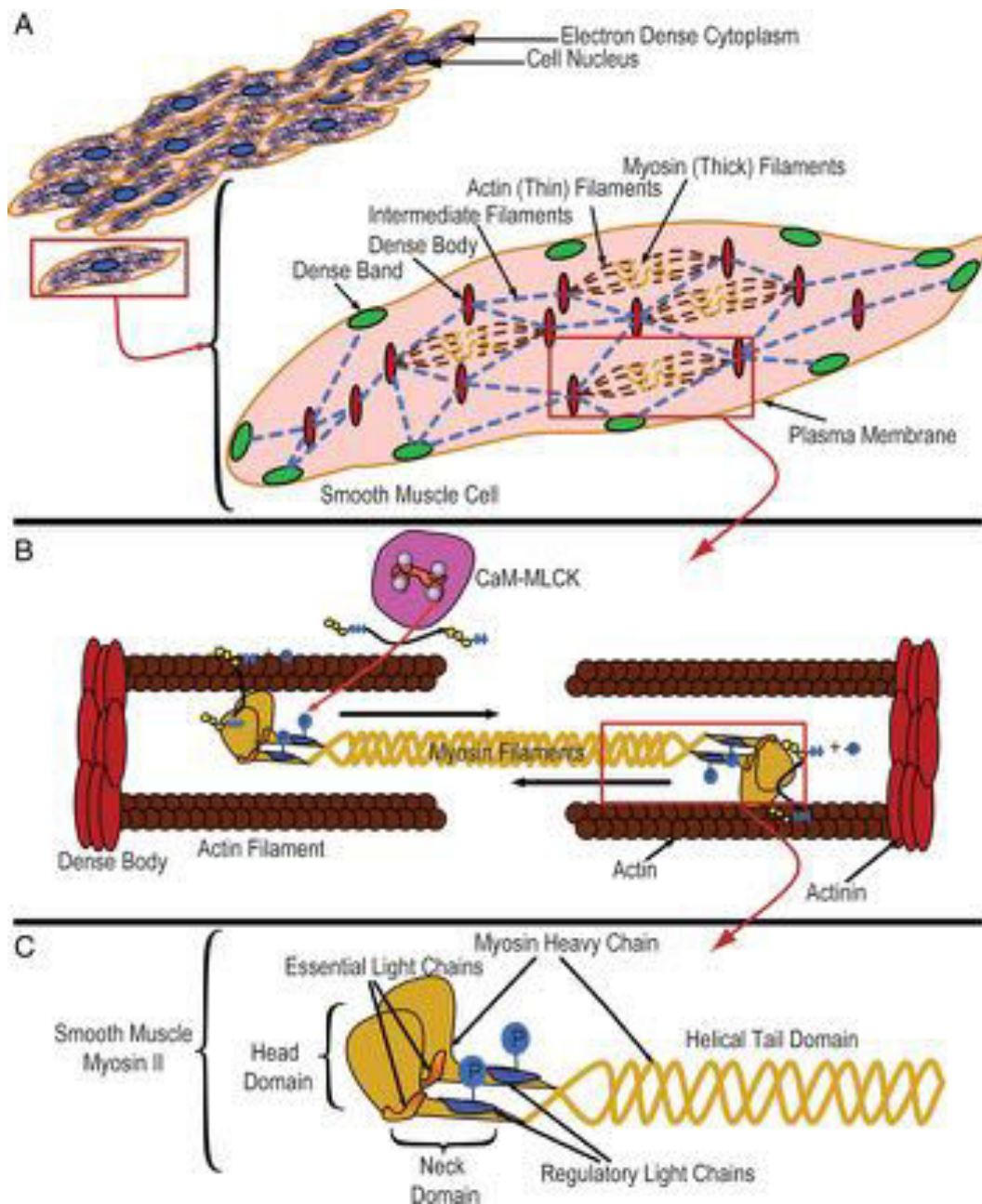


Figure 7: Aspect moléculaire intracellulaire de la contraction du myocyte.

En pratique clinique, les agents tocolytiques (pour inhiber les contractions utérines) sont administrés en cas de menace d'accouchement prématuré. Les plus efficaces sont les bloqueurs des canaux calciques et les inhibiteurs de la cyclooxygénase, enzyme limitante de la production des prostaglandines. Les bêta-mimétiques ont été très utilisés jusqu'aux années

1990 et dernièrement ont été introduits les antagonistes du récepteur à l'ocytocine. Les bloqueurs de canaux calciques sont les mieux tolérés par la mère et le fœtus. Les bêta-mimétiques présentent le plus d'effets secondaires maternels, alors que les inhibiteurs de la cyclooxygénase et les antagonistes de l'ocytocine sont les mieux tolérés par la mère. Cependant, les inhibiteurs de la cyclooxygénase peuvent être délétères pour la fonction rénale fœtale et les effets fœtaux et néonataux des antagonistes du récepteur à l'ocytocine restent peu connus. La tocolyse a une efficacité limitée, retardant l'accouchement de 48h. Elle reste toutefois utile car elle permet de mettre en place les deux prises en charge qui ont montré leur efficacité pour améliorer le devenir de l'enfant prématuré, à savoir le transfert *in utero* vers une maternité de niveau II ou III selon le terme de la grossesse et la corticothérapie anténatale. Cependant par manque de marqueurs fiables de l'imminence de la survenue de l'accouchement, une proportion importante de femmes en menace d'accouchement prématuré sont susceptibles d'avoir été traitées alors qu'elles ont accouché à terme.

5.2 Les modifications cervicales

Le remodelage du col commence par son ramollissement qui est un processus lent et progressif durant toute la grossesse. Il se caractérise par une augmentation de la compliance du tissu, tout en garantissant une fermeture du col efficace. Le ramollissement précède la phase de maturation, qui est une accélération du phénomène associée à une perte de l'intégrité du tissu. Cette perte est nécessaire à la dilatation cervicale qui sous l'effet des contractions utérines au cours du travail obstétrical doit permettre le passage du fœtus à terme. Enfin, après l'accouchement, le col reprend progressivement une configuration antérieure à l'accouchement par des processus de réparation tissulaire post-nataux. Le remodelage cervical résulte de changements protéiques de la MEC (collagène, protéoglycanes, acide hyaluronique,

décorine), des changements de la barrière épithéliale et des modifications immunitaires [169]. Le collagène est la protéine majoritaire du col de l'utérus qui a un rôle majeur dans le contrôle de la tension du col. Ses propriétés sont modulées en partie par des changements de synthèse, de modifications post-traductionnelles, d'assemblage et de dégradation des fibres. Liggins fut le premier à proposer un modèle impliquant les cellules inflammatoires dans les changements de la MEC du col de l'utérus menant à la maturation cervicale [170]. L'infiltrat inflammatoire et la libération de métalloprotéases (MMP) participent à la dégradation du collagène, ce qui modifie la structure même du col. Les cytokines, en particulier IL-8, sont impliquées dans le processus de maturation cervicale dont l'augmentation est corrélée avec celle de l'infiltration leucocytaire et des MMP dans le tissu [171, 172]. Par ailleurs, les concentrations d'IL-1beta, de TNF-alpha et d'IL-6 dans le segment inférieur de l'utérus augmentent également avec la dilatation cervicale [173] et affectent la production de TIMPs (*Tissue inhibitor of MMP*) et de MMPs par les fibroblastes et les cellules musculaires lisses du col [174]. La sécrétion de PGE2, qui est modulée par de nombreuses cytokines, stimule également la libération d'IL-8 à partir des tissus du col utérin, régule l'activité d'enzymes protéolytiques et induit la maturation cervicale [175, 176]. En outre des travaux sur ces cultures de fibroblaste du col avaient montré que l'IL-1beta activait la synthèse des glycosaminoglycanes induite par l'augmentation de l'expression de la protéine COX-2 et *in fine* la production de PGE2, et également améliorait la sensibilité des fibroblastes du col pour la PGE2 par une régulation sélective de l'expression d'ARNm des récepteurs EP [177].

La maturation du col utérin permet d'obtenir des conditions cervicales optimales pour un déclenchement artificiel du travail. Cette maturation cervicale est le plus souvent induite par des prostaglandines intravaginales (PGE2, système de diffusion vaginale PropessTM). Le principal effet secondaire est la provocation d'une hyperstimulation utérine, compte-tenu de l'action contracturante de PGE2 sur le myomètre, pouvant causer une souffrance fœtale. Il

avait été proposé que des donneurs de monoxyde d'azote pouvait induire la maturation du col sans hyperstimulation utérine [178, 179]. Cependant, récemment, une étude multicentrique, randomisée, en double insu, contrôlée contre placebo n'a pas mis en évidence de bénéfice des donneurs de NO dans la réduction du taux de césariennes suite à une induction du travail chez la femme nullipare avec un col défavorable [177].

5.3 La rupture physiologique des membranes fœtales

Au cours de la grossesse, l'intégrité des membranes et leur adaptation à la croissance de la cavité amniotique sont le fruit d'un équilibre entre la dégradation et le renouvellement de leur matrice. La perturbation de cet équilibre par des processus vraisemblablement intriqués pourrait être à l'origine de leur rupture. Les mécanismes de rupture ont longtemps été considérés comme une conséquence mécanique des contractions utérines ; la répétition des contractions entraînerait de micro-cassures qui aboutiraient à une fission des membranes et à leur rupture physique. C'est cependant le groupe de John Moore qui décrit en 2006 la cascade d'événements conduisant leur rupture : se succèdent une distension des membranes avec une perte de l'élasticité, une séparation du chorion de l'amnios au niveau de la couche spongieuse, une rupture du chorion, une protrusion de l'amnios à travers le chorion rompu, et enfin, car il atteint sa limite d'élasticité, une rupture de l'amnios [180].

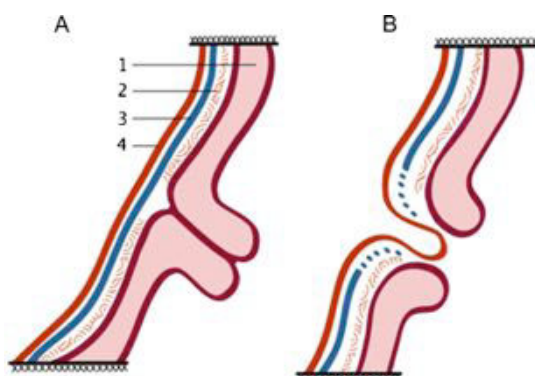


Figure 8 : Mécanismes de rupture des membranes fœtales humaines. (A) Pendant la grossesse, les membranes accolées tapissent la cavité utérine. Une zone de morphologie altérée en regard du col utérin apparaît en fin de gestation. (B) Dans le mécanisme de rupture, le chorion se déchire en premier. L'amnios distendu fait hernie dans la brèche du chorion et va se rompre. 1 : myomètre et col utérin ; 2 : décidue ; 3 : chorion ; 4 amnios. D'après C. Méhats [48]

La rupture du chorion n'est pas mécanique mais biochimique avec des altérations de la MEC et une augmentation des activités protéasiques. Ainsi à terme, il est décrit que la zone des membranes fœtales recouvrant le col de l'utérus, présumée pour être le site de leur future rupture, présente des faiblesses physiques associées à une perturbation du tissu conjonctif [181, 182]. Ces observations suggèrent que des modifications moléculaires locales se mettent en place plusieurs semaines avant l'accouchement, de façon concomitante avec le développement du segment utérin inférieur et le ramollissement du col utérin [183]. Nous reviendrons plus longuement sur ce concept lors de la présentation de nos résultats.

5.4 Déterminisme de la parturition

Un début du travail au terme approprié de la gestation est essentiel au succès de la reproduction et à la survie de l'espèce : ni trop tôt en raison des conséquences délétères de la prématurité sur le nouveau-né, ni trop tard en raison du risque de mort fœtal *in utero* en cas de dépassement du terme. Si le début du travail peut être un événement « bruyant », il résulte en fait d'une maturation progressive du processus de contrôle dont le but est de maintenir initialement la grossesse jusqu'au terme avant de permettre l'expulsion du fœtus de l'utérus au moment opportun à sa vie extra-utérine.

- **Le bloc « progestérone »**

La parturition chez toutes les espèces vivipares semble être contrôlée par des signaux provenant à la fois de la mère et du fœtus. Depuis plus de 50 ans, la progestérone est reconnue comme l'hormone-clé au centre du contrôle de la grossesse. Des études chez la lapine avaient permis de démontrer que la suppression (chirurgicale ou pharmacologique) de la progestérone

dans la circulation maternelle était nécessaire et suffisante pour induire la parturition et que la supplémentation en progestérone pouvait retarder la parturition normale. Ainsi, en 1910, le gynécologue Ludwig Fraenkel en reprenant l'hypothèse de l'anatomiste Gustav Jacob Born (1851-1900) avait fourni la preuve expérimentale de la fonction endocrine du corps jaune et noté son rôle prépondérant dans le maintien de la grossesse en montrant que la destruction du corps jaune (ou l'ovariectomie) en fin de gestation induisait une mise bas dans les 24 heures chez les lapines. En 1929, Allen et Corner avaient montré que l'implantation et le maintien de la grossesse chez les lapines ovariectomisées 18 heures après la conception étaient garantis par l'injection d'extrait de corps jaune et ce même au delà du terme. L'idée qu'une hormone du corps jaune puisse être responsable de changement « pro-gestationnel » de l'utérus nécessaire au déroulement normal de la grossesse était née. La progestérone fut purifiée en 1934 par Butenandt, Westphal et Cobler.

Ces expériences avaient montré le lien étroit entre la progestérone, le corps jaune et le maintien de la grossesse chez le lapin, le rat et la souris. En revanche, chez le chien, le cochon d'inde, le chat et le babouin, la présence du corps jaune n'est plus nécessaire dans la deuxième partie de la grossesse. De même l'ovariectomie chez des femmes en cours de grossesse avait montré son absence d'impact sur le déroulement de la grossesse. Ces observations suggéraient que la synthèse de la progestérone par le corps jaune était complètement relayée par le placenta avant la deuxième partie de la grossesse chez la femme ce d'autant que Salhanick, Noall, Zarrow et Samuels avaient montré en 1952 que le placenta humain produisait de la progestérone. Zarrow et Neher en 1955 avaient ensuite montré une augmentation constante dans le sérum de la progestérone jusqu'au terme et une légère baisse seulement 10 heures après l'accouchement.

Csapo et *al.* avaient établi chez les lapines que le placenta via la progestérone exerçait un effet local sur le myomètre et que la fin de la grossesse était associée à une perte de cet

effet. Ils avaient conclu que la progestérone perturbait l'équilibre ionique de la cellule myométriale (diminution intracellulaire de potassium et augmentation du sodium) responsable d'une diminution des gradients électrochimiques, entraînant une diminution de la propagation des potentiels de membranes. La progestérone participait aussi à limiter la concentration intracellulaire de calcium, suggérant qu'elle induise un blocage du couplage excitation-contraction, l'activité contractile ne pouvant ainsi se propager et générer une contraction globale organisée [184].

Plus récemment, le concept de lutéolyse nécessaire à la parturition avait été démontré chez la souris par les travaux de Sugimoto. Dans un modèle de souris invalidée pour le gène codant pour le récepteur de la prostaglandine F2 alpha (FP), la grossesse se déroulait normalement, mais les souris étaient incapables de mettre bas et ne répondaient pas à l'ocytocine exogène en raison de l'absence du récepteur. Les auteurs avaient montré que la diminution normale des concentrations sériques de progestérone qui précède la mise-bas chez la souris n'avait pas lieu. Seule l'ovariectomie au 19^{ème} jour restaurait l'induction du récepteur de l'ocytocine et la mise bas de ces souris déficiente en récepteur FP. Ces résultats indiquent que la parturition est déclenchée lorsque la prostaglandine F2 alpha interagit avec le récepteur FP dans des cellules ovariennes des souris pour induire une lutéolyse et ainsi une diminution de la concentration de progestérone [185].

Les limites du bloc « progestérone » dans l'espèce humaine sont liées au fait i) que l'administration de progestérone ne peut maintenir indéfiniment la grossesse, ii) que la relation temporelle entre les concentrations plasmatiques de progestérone et le début de la parturition n'implique pas nécessairement un lien causal, iii) enfin, que chez la femme la progestérone ne diminue pas avant l'accouchement, ce qui laisse penser que l'absence d'action locale de la progestérone n'est pas dépendante de sa concentration sérique. L'action de la progestérone pourrait se faire par voie systémique, ou localement en agissant dans un

mode paracrine et / ou autocrine.

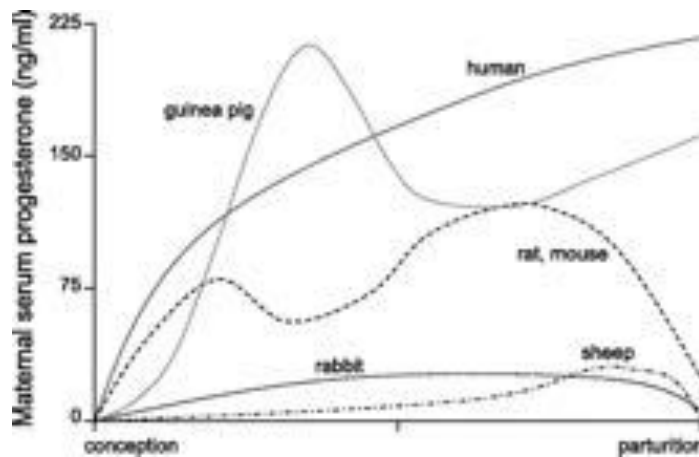


Figure 9: Concentrations sériques maternelles de progestérone pendant la gestation. Dans certains modèles animaux, il se produit un retrait brutal de la progestérone à partir de la circulation maternelle avant la parturition. Les niveaux de progestérone sont maintenus à une concentration élevée et croissante tout au long de la parturition seulement chez le cochon d'inde et l'homme, *d'après B.F. Mitchell, [186]*

Ainsi, l'idée d'un retrait fonctionnel de l'action de la progestérone permet de comprendre que l'effet « pro-quiescent » de cette hormone peut être supprimé alors que les concentrations plasmatiques maternelles de l'hormone continuent à augmenter avant et pendant le travail. L'hypothèse d'un blocage fonctionnel périphérique de l'action de la progestérone n'est pas complètement élucidé et fait l'objet de plusieurs hypothèses (Figure 13):

- A : une synthèse et métabolisation de l'hormone selon un mode paracrine au sein des membranes fœtales et de la décidue maternelle adjacente au myomètre.
- B : une modification de l'expression des isoformes des récepteurs à la progestérone avec une augmentation des isoformes PR-A et-C au profit de l'isoforme PR-B.
- C : une dégradation locale de la progestérone en métabolites aux propriétés locales différentes.
- D : Une modification de l'expression de facteurs de transcription ou de co-régulateurs des récepteurs à la progestérone au sein des myocytes.

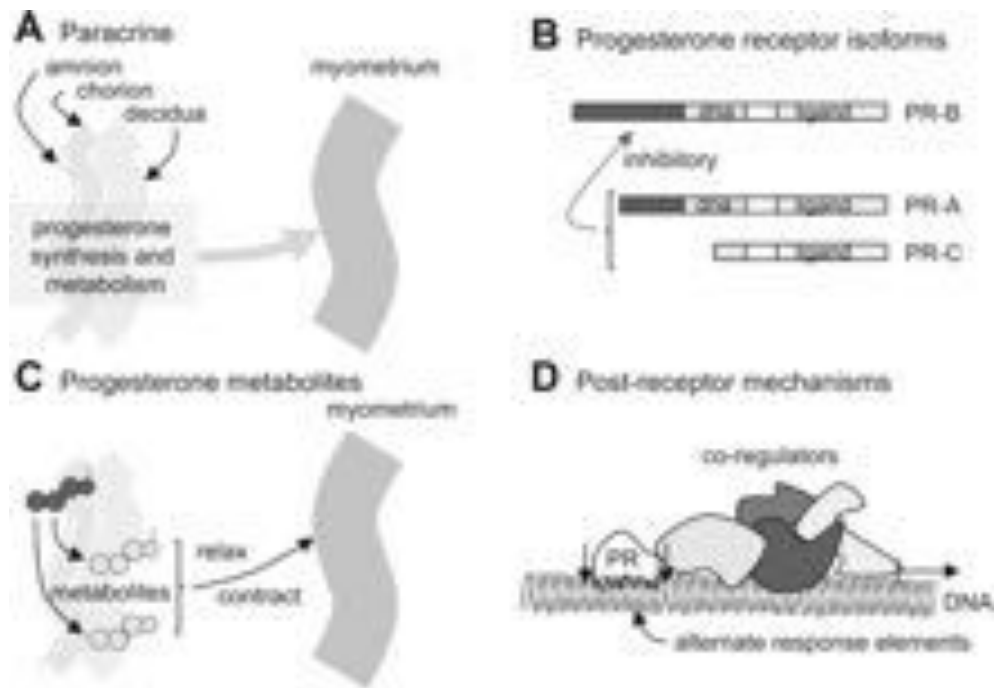


Figure 10 : Mécanismes potentiellement impliqués dans l'inaction périphérique de la progestérone. D'après B.F. Mitchell, [186].

Le groupe de Carole Mendelson poursuit ses travaux sur la diminution fonctionnelle de la progestérone dans le contrôle de la quiescence myométriale et dernièrement a mis l'accent sur un rôle pivot des protéines ZEB1 et ZEB2, sous le contrôle de la progestérone, dans le contrôle de différentes fonctions :

- la répression du cluster de microARNs, miR-200, qui régule directement leur expression et celle de STAT5B –qui inhibe l'expression de la 20alpha-HSD, un membre de la superfamille des aldo-cétoréductases responsables de la conversion de la progestérone en un métabolite inactif-,
- l'activation de miR199a-3p et miR-214, qui réprime l'expression de la PTGS2,
- la répression directe de l'expression de gènes comme le récepteur à l'ocytocine et de protéines des *gap junctions*.

ZEB1 et ZEB2 sont réprimés en fin de grossesse dans le myomètre augmentant l'expression de protéines pro-contractions et l'inactivation de la progestérone en partie *via* un mécanisme épigénétique [187].

- **Le cortisol fœtal**

En 1933, Malpas, un obstétricien anglais, avait rapporté une série de cas de grossesses prolongées chez des femmes enceintes de fœtus anencéphales qui présentaient des anomalies de développement de la région frontale du cerveau suggérant un rôle du système hypophysaire dans l'activation de mécanismes du travail [188]. Plus tard, entre 1959 et 1967, les travaux de Kennedy et Holm avaient établi que les bovins dont les fœtus avaient des anomalies de développement de l'axe hypophyso-surrénalien (aplasie de l'hypophyse antérieure) présentaient une prolongation de la gestation bien au-delà des 280 jours physiologiques (entre 292 et 526 jours) [189]. D'autres observations avaient montré une prolongation de la grossesse chez des agneaux dont le fœtus présentait des anomalies surrénaliennes de type addisonnien (Holm 1967). Au cours de la même période, en collaboration avec Kennedy et Holm, en 1965, Liggins avait montré qu'une destruction de 70% de l'hypophyse fœtale chez l'agneau était associée à une prolongation de la grossesse [190]. A l'inverse, l'administration d'ACTH ou de glucocorticoïdes *in utero* au fœtus était associée à un accouchement prématuré [191].

Ainsi, chez le mouton, il existe un lien étroit entre la maturation de l'axe hypothalamo-hypophysaire et l'initiation du travail : le *corticoid releasing hormone* (CRH) produit par l'hypothalamus régule la production hypophysaire de l'ACTH et *in fine* la production surrénalienne de glucocorticoïdes, première étape de l'initiation de la cascade endocrine de la parturition. Le cortisol fœtal a une action sur les concentrations plasmatiques maternelles

d'hormones stéroïdiennes [192]. En effet, au cours des 2-3 jours avant la fin de la gestation, survient une augmentation de la concentration du cortisol fœtal, induisant l'activation de la synthèse d'une 17 alpha-hydroxylase placentaire qui transforme la progestérone en 17alpha-hydroxyprogesterone, précurseur de l'estrogène.

Ce mécanisme ne concerne pas directement l'espèce humaine. D'ailleurs, les traitements par corticoïdes utilisés dans la maturation pulmonaire fœtale, en cas de menace d'accouchement prématuré, n'induisent pas le travail obstétrical [193].

- **Prostaglandines**

Comme noté précédemment, les prostaglandines (PGs) ont un rôle-clé dans la contraction myométriale et la maturation cervicale. La synthèse et le métabolisme des PGs sont compartimentés dans les membranes fœtales. Au milieu des années 1970, MacDonald *et al.* avaient étudié le rôle des prostaglandines dans l'initiation de la parturition. L'acide arachidonique non estérifié, précurseur obligatoire de PGF2alpha et PGE2, est fortement prédominant à hauteur de 20% des acides gras trouvés dans les membranes fœtales humaines obtenues à terme et avant travail alors qu'il ne constituait que 0,4 % des acides gras du péritoine pariétal de la mère. Il avait également été montré une diminution de la concentration de l'acide arachidonique dans les membranes fœtales obtenues à partir de femmes en travail par rapport à celle observée avant travail [194]. La même équipe avait établi que la phospholipase A2 impliquée dans la biosynthèse des PGs était fortement exprimée dans les membranes fœtales et dans la choriocidua [195].

Les enzymes impliquées dans la synthèse des PGs en particulier de PGE2 sont la prostaglandine-endopéroxyde synthase, la PTGS1 (COX-1) exprimée de façon constitutive et

la PTGS2 (COX-2) inductible [196]. Les membranes fœtales expriment également diverses prostaglandine E synthases (PTGES1, PTGES2 et PTGES3) [197, 198]. La principale enzyme responsable de leur catabolisme est la 15-hydroxy prostaglandine déshydrogénase (PGDH) [199, 200]. L'activité spécifique de la PTGS2 dans l'amnios était significativement plus élevée après le travail qu'avant le travail [201]. Dans la décidue avant le travail, l'activité enzymatique de la PGDH est élevée et devient indétectable après l'accouchement [202]. Schématiquement, l'amnios est le siège d'une forte activité de synthèse via les PG synthase alors que l'activité de PGDH prédomine dans le chorion. Le métabolisme des prostaglandines par les cellules du trophoblaste chorionique constituerait une barrière métabolique pendant la grossesse empêchant le libre transfert des PGs générées au sein de l'amnios ou du chorion vers la décidue et le myomètre sous jacent. L'activité de l'enzyme PGDH apparaît alors être au centre de la régulation de l'activité contractile du myomètre (Figure 11). Elle est régulée par les glucocorticoïdes, des cytokines et la progestérone. L'équilibre entre les facteurs activateurs (progestérone) et inhibiteurs (cortisol, IL-1 et TNF) serait ainsi déterminant dans le contrôle de la parturition.

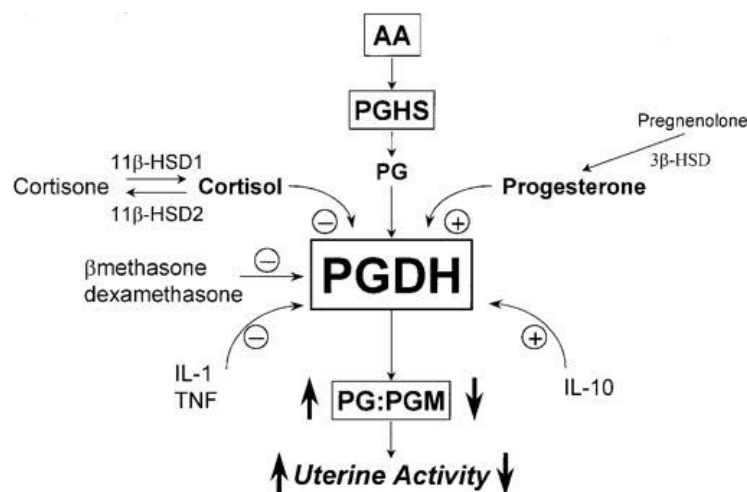


Figure 11: Régulation de la PGDH dans le contrôle de la contractilité utérine. *d'après Challis et al. [203]*

- **Inflammation intra-utérine**

Le travail obstétrical dans l'espèce humaine est associé à une inflammation intra-utérine, caractérisée par une augmentation des concentrations de cytokines pro-inflammatoires dans le liquide amniotique, une signature d'inflammation aiguë dans les membranes fœtales après rupture des membranes et accouchement par les voies naturelles et l'infiltration de neutrophiles et macrophages dans le myomètre et le col [204]. Des études *in vitro* ont montré que les cytokines pro-inflammatoires stimulent par exemple la production de PGs dans les membranes fœtales humaines à terme [205-208] en augmentant l'activité de PTGS2 et en réduisant l'activité de PGDH [209]. Les cellules immunes infiltrées sécrètent elles-aussi des cytokines pro-inflammatoires qui promeuvent l'activation des facteurs de transcription NF-kappaB et AP-1, aptes à l'antagonisme des récepteurs à la progestérone et des protéases digérant la MEC. Cette inflammation alimenterait une cascade « en avant » qui culmine avec la parturition. Cependant, à ce jour, le déterminant de cette inflammation stérile reste inconnu.

- **Autres mécanismes**

Il a été proposé une « horloge » de la parturition sous plusieurs formes. Des études ont montré qu'il existait une association entre les niveaux plasmatiques de la CRH chez la mère et le timing de la parturition. L'équipe de R. Smith avait montré une variation de l'expression placentaire du gène de la CRH [210] : il existait une augmentation plasmatique maternelle exponentielle des concentrations CRH avec l'avancement de la grossesse associé à une baisse concomitante des concentrations *CRH binding protein* en fin de grossesse, conduisant à une augmentation rapide des taux circulants CRH bio-disponible à un moment qui coïncidait avec le début de la parturition. Ces observations suggérant que la CRH pouvait agir directement

comme un déclencheur de la parturition et son origine placentaire avaient conduit les auteurs à proposer le concept de « d'horloge placentaire ».

Cette idée a été plus récemment reprise et reliée au vieillissement placentaire. Il a ainsi été proposé que le raccourcissement des télomères des cellules des annexes fœtales à la fin de leur vie éphémère pouvait avoir un rôle via la voie des TLR9 dans la signalisation de l'apoptose placentaire et des membranes fœtales [211]. Dans le même registre, le même auteur, Mark Philippe, avait suggéré que la libération dans la circulation maternelle d'ADN fœtal circulant, induit par l'apoptose placentaire au cours de la gestation, pouvait contrôler la parturition, via une activation du récepteur TLR9 d'une inflammation utérine par l'ADN fœtal circulant sous forme hypo-méthylée [212]. Si l'idée que l'ADN fœtal circulant puisse arbitrer un dialogue fœto-placento-maternel pour signaler le début du travail pendant la grossesse normale reste fascinante, cette hypothèse n'a à ce jour jamais été vérifiée. Dans les cas de grossesses compliquées par un retard de croissance intra-utérin, de prééclampsie ou dans le cas de grossesses multiples, il existe un raccourcissement télomérique de l'ADN placentaire tout comme le relargage accru d'ADN fœtal dans la circulation maternelle sans provoquer un accouchement prématuré spontané. A ce jour, aucune modification maternelle des concentrations d'ADN systémiques n'a été démontrée de façon non-ambiguë associée à l'accouchement à terme.

Enfin, dans le registre « signal fœtal », une étude élégante du groupe de Carol Mendelson avait montré chez la souris que le *surfactant protéine-A* (SP-A) pourrait servir de signal hormonal pour la parturition. Le surfactant pulmonaire est synthétisé par les cellules pulmonaires alvéolaires de type II de façon croissante pendant la gestation et sa sécrétion dans le liquide amniotique est augmentée en fin de gestation. Le SP-A stimule l'expression d'IL-1 β dans les cultures de macrophages du liquide amniotique, qui migrent ensuite dans le myomètre maternel et activent une cascade inflammatoire. Cependant, dans l'espèce humaine,

les macrophages retrouvés à l'interface foeto-maternelle sont d'origine maternelle. De plus, la durée de la première gestation n'est pas prolongée chez les souris invalidées pour les gènes SP-A, SP-D et SP-A/D. Dans le cas du double KO SPA/D, les souris gestantes présentent un délai dans la mise-bas à la deuxième gestation et leur myomètre expriment des taux significativement plus faibles de l'IL-1 β , IL-6, et de CAP, de connexine-43, et de récepteur de l'ocytocine, comparé aux souris contrôles [213]. Très récemment, cette équipe est allée plus loin en montrant, toujours chez la souris, que l'inactivation de deux facteurs de transcription, SRC-1 et SRC-2 essentiels pour la synthèse des lipoprotéines du surfactant pulmonaire entraîne un allongement du délai de la mise en route du travail. Le mécanisme mis en jeu serait la production de facteurs fœtaux issus du poumon, qui diffusent via le liquide amniotique, et qui ont la capacité d'activer les cellules immunes à l'interface materno-fœtale, entraînant une inflammation intra-utérine, un déclin de la fonction de la progestérone, les contractions myométriales et la parturition. La pertinence de ce mécanisme dans l'espèce humaine reste à prouver [214].

Pour conclure, le chaînon manquant est le lien qu'il existe entre un potentiel signal fœtal et/ou placentaire dans l'espèce humaine et l'activation d'événements pro-inflammatoires, en particulier en l'absence d'invasion microbienne ou d'infection de la sphère gestationnelle.

Finalement, il est légitime de supposer que la gestation constitue un challenge immunitaire pour la mère et le fœtus en développement ; pour l'un, ne pas rejeter la progéniture *in utero* et garder la capacité de se défendre contre les agents pathogènes ; pour l'autre, pouvoir s'implanter et se développer pendant une période donnée jusqu'au moment opportun pour une vie extra-utérine. Le rôle de l'immunité adaptative dans l'implantation et dans le maintien de la grossesse pourrait avoir un rôle déterminant dans la symbiose transitoire de deux types cellulaires génétiquement et immunologiquement différents. Le bon

déroulement de la grossesse semble reposer sur un verrou immunologique qui pourrait disparaître dans les cas d'accouchement prématuré ou dans l'initiation de la parturition.

6 ASPECTS IMMUNOLOGIQUES DE LA GROSSESSE

Peter Medawar, biologiste britannique qui a obtenu le Prix Nobel de Physiologie en 1960 pour ses travaux pionniers sur la tolérance immunologique acquise, avait émis en l'hypothèse, en 1953, que la grossesse pouvait être considérée comme une allogreffe, s'interrogeant sur les capacités de « l'organisme maternel (...) des mammifères vivipares, [à] accepter pendant des semaines, des mois, voire plus d'une année, un organisme pour moitié d'origine paternelle, comme une véritable greffe ? » [215]. Il posait les bases du concept de fœtus semi-allogénique pour la mère, qui pourrait d'un point de vue immunologique être considéré comme une « allogreffe » tolérée transitoirement.

L'idée que le fœtus et ses annexes extra-embryonnaires expriment des molécules d'origine paternelle, normalement reconnues par la mère comme du « non-soi » a depuis fait l'objet de nombreuses discussions. Jusque dans les années 1990, de nombreuses études sur l'énigme immunologique de la grossesse ont été menées à partir de la perspective que l'«allogreffe» fœtale s'apparentait à un organe transplanté chirurgicalement. Mais faire le raccourci que la grossesse puisse être associée à une transplantation est bien loin de la réalité [216]. Il n'y aurait d'autre perspective, sinistre, que celle de donner une autre explication au sens du mot « rejeton ».

En effet, le système immunitaire d'une femme enceinte ne se limite pas à un état passif d'immunosuppression ou d'ignorance des antigènes fœtaux. Les leucocytes qui résident dans l'utérus gravide ne sont pas typiques des transplantations chirurgicales d'organes [217]. En plus de conserver la capacité de se défendre contre les agents infectieux pathogènes, ces leucocytes sont à l'origine d'un environnement équilibré, où l'invasion trophoblastique est contrôlée, le fœtus nourri par la mère et la durée de la grossesse déterminée pour permettre la naissance d'un enfant en bonne santé et apte vivre à l'air libre.

La dérégulation du système immunitaire maternel par des facteurs génétiques, épigénétiques et environnementaux peut être à l'origine d'hypofertilité, de fausses couches et de complications obstétricales telles que la prééclampsie, le retard de croissance intra-utérin, la rupture prématurée des membranes fœtales et l'accouchement prématuré. Ces pathologies pourraient avoir alors en commun des anomalies de la mise en place des annexes fœtales et des contrôles immunologiques et endocriniens à l'interface fœto-maternelle. Le système immunitaire pourrait en sus avoir un rôle dans les mécanismes qui concourent à l'accouchement, nous y reviendrons.

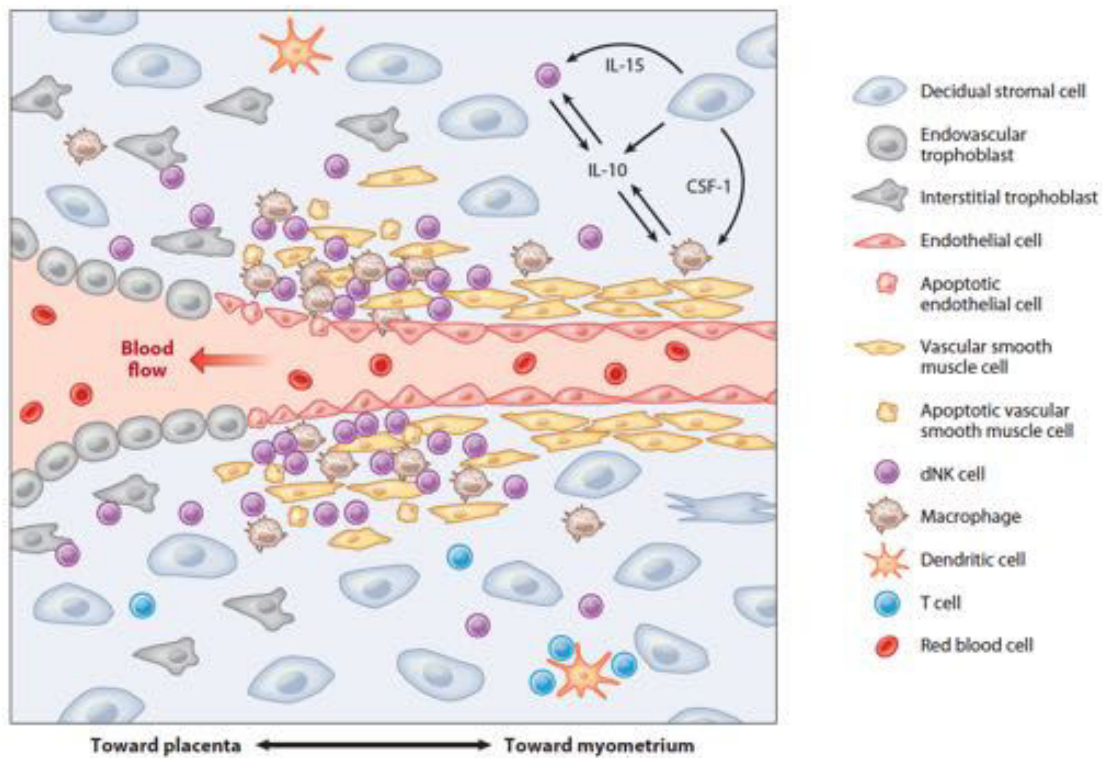


Figure 12 : Principaux constituants déciduaux cellulaires du premier trimestre de la grossesse montrant le remodelage d'une artériole spiralé. Dans la première phase de remodelage, les cellules NK déciduale (dNK) et des macrophages s'accumulent autour de la paroi du vaisseau. Le vaisseau est envahi par un sous-ensemble de trophoblastes extravilleux appelés trophoblastes endovasculaires. *D'après A. Erlebacher [217].*

6.1 Principaux acteurs immunitaires à l'interface materno-fœtale

De nombreux types de leucocytes peuplent l'interface materno-fœtale, chacun avec des fonctions diverses dans l'implantation, le développement placentaire, l'accouchement et le contrôle des pathologies infectieuses [218-220]. Les cellules immunitaires qui peuplent la décidue sont d'origine maternelle. En début de grossesse, les leucocytes déciduaux représentent 40 % de toutes les cellules déciduales dont 70 % de lymphocytes *Natural Killer* (NK) qui expriment le marqueur de cluster de différenciation CD56 [221], 20 % de cellules dérivées des monocytes tels que les macrophages impliquées dans l'immunité innée, et 10 % lymphocytes T, impliquées dans l'immunité adaptative. La présence de cellules dendritiques est avérée dans l'espèce humaine mais leur pourcentage est plus controversé. Les lymphocytes B et les cellules NKT sont rares [222]. A noter en préambule de ce chapitre que la majorité des études publiées sur l'immunité de la grossesse s'appuie, pour l'espèce humaine, sur des analyses des populations de cellules périphériques tout au long de la grossesse ou sur des cellules déciduales au premier semestre de la grossesse et sur des modèles murins, croisements syngéniques ou allogéniques et/ou avec des antigènes placentaires de substitution avec les limites d'interprétation et d'extrapolation qu'ils présentent pour l'interface fœto-maternelle chez la femme.

Ce chapitre n'a pas l'ambition d'être exhaustif, nous avons recherché à éclairer certains points particuliers qui nous ont été utiles au cours de l'analyse de nos résultats.

6.2 Cellules Natural Killer

De façon générale, les lymphocytes NK sont surtout connus pour leur cytotoxicité spontanée envers des cellules tumorales ou infectées. Les cellules NK ciblent les cellules pathologiques en raison de l'absence ou de la faible expression à leur surface de molécules du

Complexe Majeur Histocompatibilité (CMH) de classe 1, à la différence des cellules saines autologues. Dans l'utérus, l'infiltration de cellules NK dans l'endomètre est cyclique et gouvernée par les hormones sexuelles, en particulier la progestérone. Ces cellules NK constituent la grande majorité des leucocytes de l'utérus alors qu'elles représentent moins de 1% des lymphocytes sanguins circulants.

Les cellules NK utérines (uNK ou dNK pour *decidual*-NK) proviennent de la circulation sanguine mais prolifèrent et peuvent également se différencier localement. Les cellules dNK sont des petites cellules agranulaires peu nombreuses en phase pré-ovulatoire alors qu'après l'ovulation, pendant la phase sécrétoire, leur nombre augmente fortement pour atteindre 30 à 40 % du contingent cellulaire du stroma de l'endomètre et correspondrait à 70 à 80 % des lymphocytes de la muqueuse utérine. Les dNK augmentent de taille et se modifient en accumulant de plus en plus de granules intra-cytoplasmiques. En l'absence d'implantation, quelques jours avant les règles, en rapport avec l'involution du corps jaune, des modifications nucléaires des cellules NK apparaissent, annonçant leur mort cellulaire [20]. En dehors de la grossesse, les cellules NK endométriales ont un répertoire de récepteurs uniques et en particulier sont négatives pour le récepteur NKp30 et certains récepteurs de chimiokines. Une étude de transcriptome comparatif entre des cellules NK isolées d'endomètre de femmes non enceintes et des cellules NK issues de décidue gestationnelle a montré de nettes différences de profil d'expression génique suggérant que les deux populations appartenaient à des sous groupes différents [223].

Au cours du premier trimestre de la grossesse, les cellules NK recrutées ou les cellules résidentes localement se différencient en cellules dNK qui ont des fonctions spécialisées et spécifiques de la grossesse. Elles portent le phénotype CD56^{bright} CD16⁻, qualifié d'immature, à la différence des cellules NK circulantes (CD56^{dim}, CD16⁺), et ne sont pas cytotoxiques. Le

TGF- β et l'IL-15, qui sont tous deux exprimés dans la décidue [224, 225], favorisent la conversion de cellules NK périphériques CD56^{dim}, CD16⁺ en cellules dNK CD56^{bright} CD16⁻ (26).

Manaster *et al.* en 2008 avaient montré que le traitement par l'IL-15 de cellules NK isolées de l'endomètre de femmes non enceintes augmentait l'expression des marqueurs NKp30 et NKp44, deux récepteurs hautement exprimés par les cellules dNK [226].

Une fois l'embryon implanté dans la muqueuse utérine, les trophoblastes extra-embryonnaires doivent être en mesure d'adopter un phénotype invasif afin de structurer l'interface foëto-maternelle et induire le remodelage vasculaire, deux étapes essentielles pour la croissance placentaire. Si les fonctions des cellules uNK sont mal connues, leur activité, leurs caractéristiques et leur abondance suggèrent qu'elles participent au processus de décidualisation et de placentation en tant que gardiennes de l'intégrité tissulaire mais aussi comme contrôleuses de l'invasion trophoblastique et du remodelage des artères spiralées de l'utérus. Les cellules NK disparaîtraient progressivement après le deuxième trimestre de la grossesse [20].

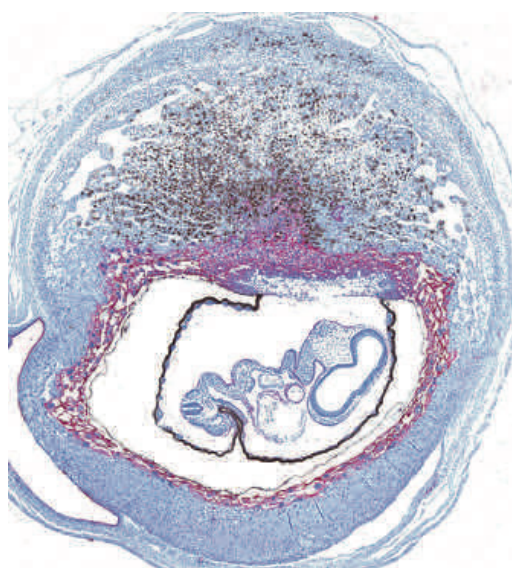


Figure 13: Implantation chez la souris montrant en marron les cellules NK et en rose les cellules trophoblastiques fœtales. *d'après A Moffet, [227]*

La fonction des dNK est régulée par une multitude de facteurs activateurs et inhibiteurs incluant des molécules du CMH de type 1 et également des molécules non-CMH. A la différence du trophoblaste villos, les cellules trophoblastiques extravilleuses n'expriment pas les CMH type 1 classiques HLA-A et HLA-B ou encore des molécules de CMH-II ce qui les rendent indétectables par les lymphocytes T. En revanche, elles expriment des molécules du CMH-1 non classiques peu polymorphes, HLA-E et HLA-G (respectivement 17 et 50 allèles distincts) et la molécule CMH-1 classique polymorphe HLA-C (2740 allèles différents au sein de la population mondiale) qui leur permettent d'interagir avec les récepteurs des cellules dNK.

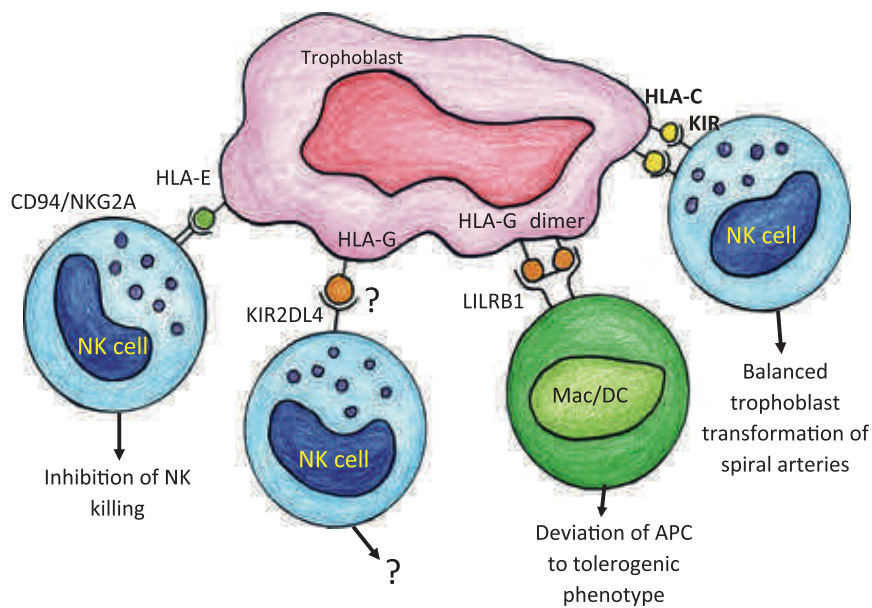


Figure 14: interaction des cellules NK maternelles avec les cellules trophoblastiques fœtales. D'après A. Moffet [227]

Les cellules NK expriment à leur surface des récepteurs de type *Killer cell immunoglobulin-like receptor* (KIR) qui se fixent préférentiellement aux molécules HLA-C. La reconnaissance des HLA-C paternels par les récepteurs KIRs maternels pourrait influencer l'invasion trophoblastique et le remodelage vasculaire, avec des effets ultérieurs sur le développement du placenta et l'issue de la grossesse (cf ci-après). D'autres récepteurs des

cellules NK interagissant avec les ligands des trophoblastes extravilloux sont bien connus dont NKG2A et LILRB1, récepteurs inhibiteurs de l'activité uNK, et NKG2C et DNAM-1, récepteurs activateurs [227].

Les fonctions modulatrices des dNK dans le contrôle de l'invasion trophoblastique [228] ont été étudiées au cours d'analyse transcriptomiques et d'immunomarquage qui avaient montré qu'à la différence des cellules NK circulantes, les dNK produisaient une large variété de chimiokines, cytokines et facteurs angiogéniques tels que le *vascular endothelial growth factor* (VEGF), le *placental growth factor* (PlGF), l'interleukine IL-8, l'interféron inducible protein (IP)-10 (CXCL9), ou encore CCL5 (RANTES) impliqués dans les deux processus majeurs que sont l'invasion trophoblastique et le remodelage vasculaire [229]. En particulier, les trophoblastes invasifs extravilloux expriment les récepteurs d'IL-8 et IP-10, respectivement CXCR1 et CXCR3.

En début de grossesse, les cellules NK participent au remplacement des cellules endothéliales des artères spiralées par les cellules trophoblastiques extravillieuses. Une étude de souris gestantes déficientes en NK a montré que, dans ce modèle, les vaisseaux déciduaux présentent une paroi plus épaisse avec une lumière plus étroite que chez les souris contrôles [230]. Connus pour sécréter de l'interféron- γ [231], les lymphocytes uNK aident aussi au recrutement et à l'activation de macrophages, qui deviennent phagocytiques et participent au remaniement vasculaire. Ainsi Hazan et *al.* avaient montré de façon élégante à partir d'un modèle de co-culture de placenta et décidue prélevés au premier trimestre de la grossesse que l'initiation de la transformation des vaisseaux déciduaux s'accompagne d'une accumulation importante de macrophages et de cellules dNK résidents avant même la présence du trophoblaste au contact des lumières des vaisseaux [232]. Un déficit de reconnaissance entre trophoblastes invasifs et dNK serait subséquent associé à un défaut de placentation à

l'origine de pathologies de la grossesse. Ainsi l'équipe de Moffet et *al.* ont mis en évidence qu'une combinaison de récepteurs KIR (présentant le génotype AA) maternels associée à la présentation de molécules HLA-C du groupe C2 d'origine paternelle (les molécules HLA-C bien que très polymorphes peuvent se diviser en deux groupes C1 et C2 selon l'acide aminé présent en position 80 dans la chaîne protéique) augmente le risque de développer une prééclampsie [233].

En conclusion, les cellules NK déciduales sont spécialement recrutées et stimulées de façon appropriée au cours des changements physiologiques de l'endomètre. Les capacités fonctionnelles uniques des cellules dNK sont orchestrées par les interactions entre leurs récepteurs spécifiques, et les ligands présentés par les trophoblastes invasifs et les cellules stromales ou épithéliales de la décidue. Ces dNK sécrètent des facteurs tels que des cytokines, chimiokines et facteurs de croissance qui leur donnent la capacité de promouvoir l'invasion trophoblastique et la transformation vasculaire au cours des premières étapes de la placentation alors qu'elles ont longtemps été considérées comme des cellules bloquant l'invasion trophoblastique excessive [234].

6.3 **Macrophages**

Les macrophages sont des cellules mononucléaires qui sont impliquées à la fois dans l'immunité innée et adaptative. Ceux qui résident à l'interface fœto-maternelle proviennent de la circulation sanguine. Ces macrophages représentent la deuxième population de leucocytes la plus abondante dans la décidue humaine (20 % du nombre total de leucocytes). Ils seraient en proportion constante au niveau de la décidue tout le long de la gestation [235, 236]. La fonction des macrophages varie en fonction de leur phénotype qui dépend de leur

environnement cytokinique conditionnant leur différenciation. Les macrophages assurent une défense antibactérienne, contribuent au remaniement tissulaire essentiel à la pénétration de l'embryon en début de gestation et peuvent avoir un rôle immuno-modulateur.

Deux populations de macrophages sont décrites dans la décidue maternelle : les macrophages de phénotype M1 aux fonctions phagocytiques classiques et les macrophages de phénotype M2 aux propriétés homéostatiques, tolérogènes et de réparation des tissus. Ces derniers permettent de réguler la réponse immunitaire en favorisant la croissance cellulaire, en inhibant la réponse inflammatoire et en contrôlant l'équilibre de la réponse des cellules T auxiliaires en faveur d'une réponse de type Th 2 « tolérogène » [237]. Bien que leur rôle ne soit pas encore entièrement décrit, ils agissent de façon princeps dans le remodelage des artères spiralées [238-240], le recrutement des cellules T régulatrices (Treg) [241] et la clairance des cellules apoptotiques [242]. Des études réalisées sur des modèles d'accouchement prématuré induits chez la souris ont montré que l'infiltration déciduale de macrophages était un événement essentiel dans l'induction du travail prématuré [243] [244].

A l'inverse, les macrophages de type M1 stimulés par des cytokines Th1 sont polarisés vers un phénotype pro-inflammatoire avec une activité phagocytaire et une capacité de défense contre les infections [21]. Même si les macrophages déciduaux sont principalement de type M2, ils se polarisent vers le phénotype M1 en cas d'infection de la sphère gestationnelle [245]. Les facteurs qui régissent leur processus de différenciation restent encore mal compris.

6.4 Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont les sentinelles de la réponse immunitaire adaptative. Elles sont subdivisées classiquement en deux catégories : les cellules dendritiques résidant dans les organes lymphoïdes (rate et ganglions lymphatiques) et celles migratoires dans les tissus périphériques. Comme les macrophages et les lymphocytes B, les cellules dendritiques sont présentatrices d'antigène en association avec une molécule du CMH aux lymphocytes T dans le cadre de la réponse adaptative. Elles ont la capacité de moduler les fonctions et l'accumulation des cellules T effectrices au sein des tissus périphériques et de les éduquer dans les organes lymphoïdes. Une question qui reste encore peu résolue est dans quelle mesure les cellules dendritiques maternelles ne parviennent-elles pas à initier une réponse immunitaire efficace des lymphocytes contre les antigènes fœtaux.

Le groupe d'Erlebacher a utilisé le modèle murin de présentation par le trophoblaste de l'ovalbumine et de transfert chez la mère de lymphocytes CD4 ou CD8 ovalbumine-spécifique pour suivre les cellules T maternelles qui prolifèrent au contact de l'antigène placentaire. Ils ont ainsi pu mettre en évidence de façon élégante que les lymphocytes maternels proliféraient uniquement dans les ganglions lymphoïdes secondaires, et non au site péri-implantatoire, à partir de la mi-gestation en relation avec l'invasion endovasculaire des trophoblastes placentaires et la libération de débris hématogènes placentaires. En outre, les cellules T CD8 + qui reconnaissent indirectement l'antigène fœtal ou placentaire subissent une délétion clonale pour leur fonction effectrice cytotoxique [246].

Dans l'espèce humaine, malgré la difficulté à isoler les cellules dendritiques sans les activer et/ou à les caractériser par des marqueurs de surface, il semblerait qu'elles soient immatures dans la décidue et assez rares (<1%) après la période post-implantatoire. Des études conduites chez la souris ont montré que les cellules dendritiques de la couche

déciduale ne contribuent pas (ou peu) à la présentation primaire des antigènes fœtaux dans les ganglions lymphatiques qui drainent l'utérus, car leur migration vers les ganglions serait bloquée par la réaction de décidualisation [247]. Chez la femme, il a été montré une diminution du nombre de vaisseaux lymphatiques à proximité des artérioles utérines, suggérant une restriction de capacité de migration des cellules dendritiques vers les relais ganglionnaires [248]. Ces données sont en faveur du rôle de la décidualisation dans la minimisation de l'immunosurveillance de l'interface materno-fœtale par les cellules dendritiques.

6.5 Lymphocytes

Suite à leur développement dans le thymus, les lymphocytes T sont considérés comme naïfs jusqu'à ce qu'ils rencontrent le premier antigène. Cette rencontre a lieu, comme suggéré précédemment, dans les organes lymphoïdes secondaires (dans la rate pour les antigènes du sang et dans les ganglions lymphatiques régionaux via les vaisseaux lymphatiques pour les antigènes des tissus périphériques) et implique des interactions avec les cellules dendritiques qui présentent l'antigène associé à une molécule de CMH de classe II pour les lymphocytes CD4⁺ et de classe I pour les lymphocytes CD8⁺. Les lymphocytes CD4⁺ se différencient en cellules T *helper* (Th) Th0 et cellules CD25^{bright} FOXP3⁺ régulatrice (Treg). Les Lymphocytes T cytotoxiques (LTC) sont les lymphocytes T CD8⁺ effecteurs impliqués dans la clairance des pathogènes intracellulaires. Les LTC ont la capacité de lyser directement les cellules cibles grâce à des molécules cytolytiques comme la perforine et la granzyme. Une fois activée, les cellules Th effectrices quittent la rate ou des ganglions lymphatiques pour migrer vers les tissus périphériques où leur comportement est localement régulé par des voies de présentation locale de l'antigène et de l'environnement cytokinique. Elles vont alors se

différencier sous forme de Th1, Th2 ou, plus récemment décrite, Th17. Enfin les sous ensembles de cellules Th exercent entre eux des actions inhibitrices par l'intermédiaire de leur propre production de cytokines.

Les Lymphocytes Th1 ont comme principal rôle de promouvoir l'élimination des cellules infectées par des virus pathogènes et les bactéries intracellulaires dans les tissus périphériques. Elles secrètent l'IL-2, le TNF et l'interferon- γ (IFN γ), le récepteur aux chimiokines CXCR3 (récepteur de CXCL9, CXCL10 (IP-10) et CXCL11) et CCR5 (récepteur CCL5 – RANTES). L'IFN γ favorise l'activation des macrophages entraînant une boucle d'auto-recrutement de cellules Th1 activées et de LCT qui, par la production de facteur de nécrose tumorale (TNF α), participent aux mécanismes d'inflammation. De façon schématique, les lymphocytes Th2 produisent de l'IL-4, IL-10 et IL-13 qui permettent de bloquer certaines fonctions des macrophages, et de réprimer la différenciation des lymphocytes CD4 vers le phénotype Th1, favorisant le maintien d'une immunotolérance. Enfin les Th17 produisent les interleukines 17, 21, 22 et concourent également au chimiotactisme et au recrutement des polynucléaires neutrophiles. Ces cellules sont ainsi impliquées dans les processus inflammatoires chroniques, les maladies auto-immunes, le cancer, l'allergie et le rejet de greffes allogéniques.

L'analyse des cellules immunitaires présentes au site d'implantation de l'embryon a montré chez la femme que les cellules T y sont plus rares que les cellules NK ou les macrophages (10 % des cellules immunitaires). Les lymphocytes T décidaux expriment les marqueurs CD3⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁺. Ils sont répartis entre les lymphocytes CD4⁺ (30 à 45 %) et CD8⁺ (45 à 70 %) [249]. Environ 5 % des lymphocytes T CD4⁺ sont des cellules Tregs, CD25^{bright} FOXP3⁺ [250]. La grossesse a longtemps été décrite comme une balance privilégiée vers un environnement cytokinique Th2 plutôt que Th1. Raisonner selon cette dichotomie est un peu

dépassé et le rôle exact des cellules CD4⁺ Th et CD8⁺ LCT à l'interface materno-fœtale en relation avec la tolérance ou le rejet des cellules fœtales reste à définir.

En outre, les modifications du métabolisme du tryptophane font partie des mécanismes de contrôle des cellules lymphocytaires. Les syncytiotrophoblastes et les macrophages décidaux ont la capacité de produire une enzyme, l'indoléamine 2,3-déshydrogénase (IDO), qui capte le tryptophane, acide aminé essentiel pour les cellules en division rapide, et induit ainsi une diminution locale de sa concentration, conduisant alors la diminution de la prolifération des lymphocytes T [251]. Enfin, au moins chez la souris, le groupe d'Erlebacher a montré que l'expression de chémokines spécifiques des cellules T est éteinte de façon épigénétique au sein des cellules déciduales stromales. Cette extinction est en partie responsable de l'absence de recrutement et d'accumulation de lymphocytes T effecteurs dans la décidue au cours de la gestation [252].

L'intérêt pour les lymphocytes Treg au cours de la grossesse est actuellement très intense. Il a été montré une expansion des Treg dans le sang pendant la grossesse humaine et dans le sang et les organes lymphoïdes secondaires jusqu'à la mi-gestation chez la souris, indépendamment des antigènes foetaux. Ces Treg ont une activité suppressive fonctionnelle des lymphocytes T. Leur présence est essentielle pour le maintien précoce de la gestation chez la souris dans un contexte allogénique [253, 254]. Plus généralement, les Tregs sont des cellules impliquées dans la tolérance immunitaire contre les antigènes du non soi (dans les greffes), dans le contrôle de la réponse aux pathogènes commensaux mais aussi contre les antigènes du soi dans la prévention de l'auto-immunité en limitant l'action des cellules auto-réactives [255]. Ces cellules sont définies par leur expression du facteur de transcription FOXP3, en liaison avec le phénotype de surface CD4⁺ CD25⁺. Les Treg sont classés en deux groupes en fonction de leur origine. Les Treg peuvent provenir du thymus (appelées cellules

Treg dérivés thymiques [tTreg] ou aussi, parfois, Treg naturel [nTreg]) ou se différencier en dehors du thymus, localement, à partir de cellules T CD4 + naïves ; ils prennent alors le nom de cellules Treg périphériques induites (cellules pTreg ou iTreg, pour induites). Les cellules tTreg sont principalement impliquées dans le maintien de l'homéostasie immunitaire et la prévention de l'auto-immunité. Les cellules pTreg sont considérées comme les plus importantes dans l'établissement de la tolérance aux interfaces telles que les muqueuses pulmonaires ou intestinales, où le système immunitaire entre en contact avec l'extérieur et est chroniquement exposé à des allergènes et autres antigènes étrangers. Schématiquement, les cellules Treg inhibent l'activation et la prolifération de cellules immunitaires encore incompetentes et bloquent les lymphocytes T effecteurs activés contre les antigènes fœtaux. La présentation des allo-antigènes fœtaux par les cellules présentatrices d'antigène, cellules dendritiques et macrophages, aux lymphocytes Treg induit l'apoptose des cellules T CD8+ cytotoxiques anti-fœtales. Les mécanismes précis d'interaction cellulaire ne sont pas encore déterminés [217]. Chez la souris, l'expansion des Treg chez la mère la rend plus susceptible pour l'infection par la listeria ou la salmonelle pendant la gestation, suggérant que la balance suppression/ stimulation de l'immunité pendant la grossesse est contrôlée par les Treg. Après mise-bas chez la souris, des cellules Treg spécifiques des antigènes fœtaux persistent en proportion abondante et s'accumulent rapidement au cours de la grossesse suivante, provenant presque exclusivement de la prolifération des Tregs spécifiques des cellules fœtales de la grossesse précédente, évoquant une mémoire protectrice contre les antigènes fœtaux [256].

Plus récemment, à l'échelon moléculaire, l'équipe de Rudzensky a montré qu'une séquence régulatrice intronique activatrice, *conserved non-coding sequence 1* (CNS1), d'origine virale, a été insérée au cours de l'évolution dans le promoteur du gène FOXP3. Cette séquence d'origine virale est hautement conservée chez les mammifères placentaires (euthériens) mais est absent chez les mammifères non-euthériens (monotrèmes et les

marsupiaux) [257]. Elle introduit un élément de réponse au TGFbeta. Chez des souris déficientes pour la séquence CNS1, le taux de résorption embryonnaire était augmenté et on observe un défaut de remodelage des artères utérines spiralées. Ces animaux ont une réduction marquée du nombre de cellules iTreg induits dans la décidue par rapport aux témoins. La diminution des cellules iTreg induites dans la décidue de souris déficientes en CNS1 était inversement corrélée à une augmentation des cellules T effectrices activées CD4+CD62Llow. Il est ainsi proposé que l'insertion de la séquence CNS1 au cours de l'évolution permet une placentation invasive et ainsi un meilleur contrôle du conflit materno-fœtal.

PARTIE 2 : DEMARCHE EXPERIMENTALE

1 PROBLEMATIQUE

Le moment de la naissance est un facteur déterminant de la santé périnatale. Il est probable qu'il existe une « cascade de la parturition » qui déclencherait le travail à terme. L'accouchement prématuré, plus qu'une « parturition précoce » serait la conséquence de phénomènes qui court-circuitent et activent cette cascade par l'intermédiaire de processus pro-inflammatoires au sein de l'utérus. Il a longtemps été postulé que l'unité fœto-placentaire contrôlait la synchronisation des mécanismes concourant à la naissance grâce à une « horloge placentaire ». Norwitz et *al.* en mettant en avant le rôle central de l'endomètre et de la décidue à l'interface privilégiaient plus le rôle d'une « horloge déciduale » dans le contrôle de la parturition [258].

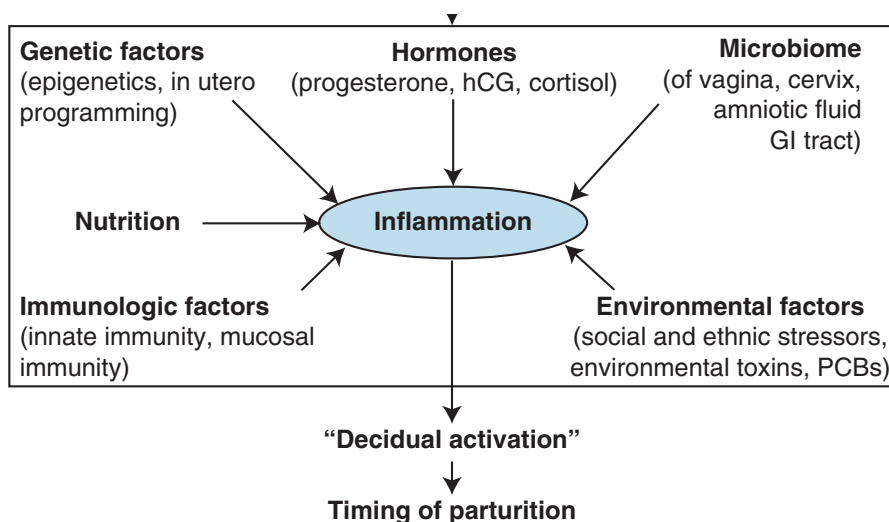


Figure 15 : Activation déciduale multifactorielle, d'après Norwitz et al. [258]

Malgré une recherche intensive, les mécanismes princeps dans l'espèce humaine qui concourent à la mise en route du travail, à terme ou de façon prématurée, demeurent non résolus.

Plusieurs obstacles s'opposent à cette compréhension : i) en dépit des nombreux modèles animaux disponibles, l'extrapolation des mécanismes mis en évidence à la parturition humaine reste limitée. Les variations interindividuelles chez l'humain, à l'inverse de modèles animaux, constituent également un obstacle à l'interprétation des données ; ii) les difficultés d'analyse des processus autocrines et paracrines supposés à l'interface materno-fœtale de l'espèce humaine rendent leurs études plus difficiles et ce d'autant que l'accessibilité aux échantillons humains de la sphère utéro-placentaire est limitée. Lorsque les tissus sont accessibles, le moment de leur recueil (fin de grossesse, avant le travail, pendant le travail, après l'accouchement) conditionne l'interprétation et la reproductibilité des analyses.

Comme nous l'avons expliqué dans l'introduction, les membranes fœtales constituent une large interface materno-fœtale où cohabitent au sein de la choriondécidue, les trophoblastes fœtaux et les cellules déciduales maternelles, en particulier les leucocytes déciduaux. L'endométriose dont la physiopathologie demeure encore non résolue est associée à des altérations de l'endomètre et de la décidue maternelle.

Notre démarche expérimentale a été dans un premier temps l'analyse des mécanismes impliqués dans l'immunotolérance de la grossesse à terme et dans un second temps d'étendre cette analyse à un modèle physiopathologique d'étude l'interface materno-fœtale en cas de modifications intrinsèques de l'endomètre liée à la maladie endométriosique.

2 MATERIEL ET METHODES

2.1 Prélèvements de tissus humains

L'étude portant sur les membranes fœtales humaines a été approuvée par le comité d'éthique local (Comité de Protection des Personnes Ile de France XI, n ° 11018, 03/03/2011). Toutes les patientes ont donné leur consentement écrit pour la participation à cette étude après information éclairée. Les placentas avec leurs membranes ont été recueillis, au sein du service d'Obstétrique de la Maternité de Port-Royal, Hôpital Universitaire Cochin, chez des femmes en bonne santé, ou atteinte d'une endométriose sévère, avec une grossesse sans complication, chez qui a été réalisée une césarienne, en dehors du travail, planifiée à terme. D'autres femmes ayant des grossesses compliquées et justifiant une césarienne entre 28 à 35 SA avant travail ont également été recrutées. La naissance prématurée avait été induite pour diverses raisons maternelles ou fœtale (retard de croissance intra-utérin, pré-éclampsie, un cas d'hématome rétroplacentaire chronique, anomalies du rythme cardiaque fœtal).

2.2 Echantillon de chorioidécidue

Les membranes fœtales recouvrant l'orifice interne du col ont été marquées lors de la césarienne avec une pince en cœur non traumatique. Les membranes fœtales ont été détachées du placenta en salle d'opération dans des conditions stériles. Dans les 15 minutes suivant la collecte, les échantillons de membranes ont été traités au laboratoire. Les membranes ont été lavées par grattage et rinçage dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBS). La chorioidécidue a été séparée de l'amnios. Des fragments de chorioidécidue à terme et avant terme ont été préparés en vue d'extractions d'ARN et d'analyses d'immunohistochimie. De la même manière, des fragments de chorioidécidue provenant de femmes atteinte d'endométriose

ont été préparés. Enfin, des échantillons de choriodécidue à terme ont également été traités et préparés pour les études de cytométrie de flux et de microscopie électronique.

2.3 Extraction des ARN totaux et RT-PCR

L'ARN total a été isolé en utilisant un kit Qiagen RNeasy (Qiagen, Valencia, CA) selon les instructions du fabricant. La pureté et la concentration des échantillons d'ARN totaux ont d'abord été évaluées en utilisant le spectrophotomètre Nanodrop (Thermo Scientific, Waltham, MA). La concentration totale d'ARN a été quantifiée par spectrophotométrie en mesurant l'absorbance à 260 nm et l'intégrité des ARN a été vérifiée au Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Tous les échantillons ayant un indice d'intégrité de l'ARN (RIN) supérieur ou égal à 6,5 ont été stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Les ADN complémentaires ont été synthétisés à partir des ARNs totaux grâce à la transcriptase inverse M-MLV (Invitrogen) selon les recommandations du fabricant. Après dénaturation à 72°C pendant 10 minutes, les ARNs totaux (4 µg) sont incubés en présence du mélange réactionnel contenant du dithiothréitol, des dNTPs, des amorces universelles hexamériques, des sels (MgCl₂, KCl) dans un tampon Tris-HCl, pH 8,3. La réaction est initiée avec l'ajout de la M-MLV RT (800 U). Le mélange est incubé 1h à 39°C, puis placé 5 min à 95°C pour dénaturer l'enzyme. Les produits obtenus sont conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

2.4 Analyse du transcriptome et traitement des données

L'analyse du transcriptome a été menée en réalisant des triplicats de pools d'échantillons d'ARN issus de trois femmes différentes. Il s'agit d'un bon compromis entre le coût élevé d'un transcriptome individuel et l'utilisation d'un pool unique, qui permet de limiter

l'influence des variations individuelles entre les patientes tout en conservant des possibilités d'exploration des possibles variations statistiques.

La synthèse, le marquage, l'hybridation et le scanner de la puce ont été réalisés par le personnel de la plateforme de génomique de l'Institut Cochin.

Pour l'étude portant sur la comparaison des la choriocarcinome en regard et à distance du col les ARNc ont été hybridés sur la puce Agilent SurePrint G3 Human GE 8x60K Microarray (Agilent Technologies) selon les instructions du fabricant. Les données brutes ont été analysées selon deux méthodes statistiques différentes :

La première analyse a été réalisée avec une programmation R suivant le progiciel « limma » [259] disponibles sur Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>) avec une correction pour la lecture des puces Agilent (normalisation quantile, analyse statistique empirique bayésienne). Un $p < 0,05$ a été considéré comme statistiquement significatif. Les données ont été publiées sur le site Gene Expression Omnibus (numéro d'accèsion : GSE50900 et GSE59686). Les sondes pour lesquelles les intensités de fluorescence normalisées sont statistiquement significatives après analyse des trois pools ont été analysées plus avant : les gènes surexprimés, réprimés ou ne variant pas sont identifiés avec un seuil de 2. L'analyse ontologique d'enrichissement des gènes a ensuite été effectuée pour ceux différentiellement exprimés en utilisant le logiciel GePS Genomatix (Release 2.4.0 Genomatix Software GmbH, Munich, Allemagne).

La deuxième analyse a été réalisée avec la suite de logiciel GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) (<http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>) en interrogeant la base de données KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). La méthode statistique employée est ici de type Monte Carlo, basée sur des permutations.

Pour l'étude portant sur les membranes fœtales en cas d'endométriose, l'expression des gènes a été évaluée par l'hybridation des échantillons d'ARNc à des puces NimbleGen 12 × 135K Microarrays (Roche NimbleGen, Roche Diagnostics, Meylan, France). Les données brutes des puces ont été traitées en utilisant le logiciel ANAIS [260]. La qualité des séquences a été évaluée au niveau de chaque sonde. Une analyse multi-Array robuste utilisant une normalisation de fond et une normalisation en quantile intra et inter-array a été effectuée. Les gènes ayant des intensités supérieures au seuil aléatoire de 95% ont été choisis pour les études ultérieures. Enfin, les sondes ont été testées pour l'expression génique différentielle avec une valeur nominale de $p \leq 0.05$ considérée comme significative. Parmi eux, les gènes ayant une variation d'intensité de plus deux fois ont été retenus pour des analyses ultérieures. Les données ont été publiées sur le site Gene Expression Omnibus (numéro d'accèsion: GSE57733). Les données transcriptomiques obtenues ont été comparées aux données de l'analyse faite par Borghese *et al.* qui portait sur le profil d'expression génique des endométriomes (OMA) par rapport à l'endomètre eutopique [261]. L'analyse ontologique d'enrichissement des gènes a ensuite été effectuée pour ceux différentiellement exprimés en utilisant le logiciel GePS Genomatix. Une valeur $p < 0,05$ a été considérée comme significative.

2.5 PCR quantitative

Les séquences des ARNm étudiés ont d'abord été téléchargées à partir du site du NIH Nucleotide (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed>). Les amorces ont été choisies à l'aide du logiciel Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) en vue d'obtenir un produit d'amplification de 100-200 paires de base. L'alignement des séquences choisies sur le génome humain a été réalisé avec le logiciel BLAST pour éviter les amplifications non

spécifiques (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Les amorces ont été fabriquées par Eurogentec (Angers, France).

Les RT-PCR quantitatives ont été réalisées à l'aide d'un amplificateur Light Cycler 480 en plaque de 96 puits (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Toutes les expériences de RT-PCR ont été menées à l'aide du kit d'amplification Light Cycler 480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) en respectant les consignes du fournisseur. Le protocole de PCR utilisait un volume total de 10 µl d'ADNc dilué au 1/10^{ème}, et consistait en une dénaturation initiale de 5 min à 95°C suivie de 40 cycles alternant une température à 95°C pendant 10 sec, puis 57°C pendant 10 sec, puis 72°C pendant 10 sec et enfin une courbe de fusion en fin de programme. Tous les couples d'amorces ont été testés sur une gamme de ADNc de concentration connue pour déterminer les droites standard d'efficacité de chaque couple. Tous les couples ont montré une bonne corrélation linéaire d'efficacité avec une pente ≥ -3.6 . Seuls les couples d'amorces ayant une efficacité en RT-PCR $\geq 90\%$ ont été utilisés.

Pour l'étude portant sur la comparaison des la chorioidécidue en regard et à distance du col, un ensemble de 35 gènes et les trois gènes de référence (contrôle interne) a été analysé par RT-PCR quantitative en utilisant un ADNc synthétisé à partir de chaque échantillon individuellement.

Pour l'étude portant sur les membranes fœtales en cas d'endométriome, un ensemble de 12 gènes, y compris les 10 gènes cibles et les deux gènes de référence (contrôle interne) a été analysé.

L'abondance relative des ARNs de chaque gène cible a été quantifiée par rapport à l'abondance d'ARNs de gènes de référence (SDHA, RPLP0, et HNRNPA1 pour la première étude et ubiquitine C et la cyclophiline B pour la seconde) selon la formule $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [262]. Les résultats ont été analysés avec le logiciel LightCycler en utilisant la méthode de dérivation seconde.

2.6 Extraction d'ADN génomique

L'ADN a été extrait de la choriodécidue en utilisant le kit DNAeasy (Qiagen) selon les instructions du fabricant. L'ADN génomique a été converti au bisulfite en utilisant le kit EZ méthylation de l'ADN (Proteogene, Saint-Marcel, France), selon le protocole du fabricant et purifié sur colonnes d'extraction. L'étape d'amplification du génome a été suivie par la fragmentation enzymatique et l'hybridation sur les puces de méthylome Infinium HumanMethylation 450 BeadChip (Illumina, San Diego, CA, USA). Cette puce comprend 485 577 positions de cytosines du génome humain (482 421 sites CpG (99,4 %), 3091 sites non-CpG et 65 polymorphismes nucléotidiques simples aléatoires). Après l'étape d'hybridation et de marquage la BeadChip a été analysée à l'aide du scanner Illumina HiScan SQ. Les intensités ont été extraites en utilisant le logiciel GenomeStudio (v.2011.1)

2.7 Analyse du méthylome

Les données du méthylome ont été traitées en utilisant le package RnBeads du logiciel R [263]. Les sondes des chromosomes X et Y ou des dinucléotides non-CpG ont été exclus. Après vérification de la qualité d'hybridation, les sondes de puces à ADN ont été filtrés et leur intensité médiane normalisée avec la méthode « Swan » [264]. Les intensités des sondes ont ensuite été converties en valeur bêta (0 pas de méthylation, 1 méthylation). Les sondes ont été testées pour la méthylation différentielle en utilisant la méthode « limma » [265]. Parmi les 485 577 sondes présentes sur la puce, 465 992 d'entre elles ont été retenues pour l'analyse ultérieure après pré- et post-filtrage. L'interaction entre le statut CpG (hypo- versus hyper-méthylé) et l'emplacement du CpG (intragénique, promoteur ou intergénique) a été testé. Une analyse d'enrichissement a ensuite été effectuée pour les régions différemment méthylés (DMR) avec un emplacement intragénique utilisant le logiciel GePS Genomatix.

2.8 Cytométrie de flux

Les échantillons de choriodécidue provenant de la zone en regard du col et à distance ont été digérés par la collagénase B (Roche, Meylan, France) pendant 45 min à 37°C. Les analyses cytométriques des lymphocytes T, cellules NK, lymphocytes Treg ont été réalisées selon des protocoles de routine [266, 267]. La caractérisation des macrophages a été faite en utilisant les marqueurs membranaires CD11c, CD68, CD206, CD14, CD40, and CD16 (Miltenyi, Paris, France). L'ensemble des données a été analysé en utilisant les logiciels FlowJo (<http://www.flowjo.com>) et Prism6 (GraphPad software, CA).

2.9 Immunohistochimie

Les tissus recueillis ont été fixés dans du formol 10 % et inclus dans la paraffine. Les immunohistochimies ont été réalisées comme décrit précédemment [268]. Des coupes de tissus de 4 µm d'épaisseur ont été réalisées séquentiellement et montés sur des lames Superfrost (Menzel-glasse, Braunschweig, Allemagne). Après déparaffinage dans du xylène, réhydratation par des concentrations d'éthanol graduées, et récupération des antigènes dans un tampon citrate à pH 6,0, les coupes ont été incubées pendant 12 heures à 4°C avec des anticorps primaires (dilué à 1: 100 dans du PBS-1% d'albumine de sérum bovin -0,1 % de Triton). L'immuno-réactivité a été révélée en utilisant le polymère Novolink en respectant les consignes du fabricant (Leica, Nanterre, France). La révélation a été faite avec du DAB, et les coupes contre-colorées avec une solution d'héματοxyline Mayer (Merck Millipore, Guyancourt, France).

Pour l'étude portant sur la comparaison de la choriodecidue en regard et à distance du col :

Les anticorps anti-HLA-F, polyclonaux, de lapin 14670-1-AP (Proteintech, Manchester, UK), anti-HLA Class 1 ABC, de souris EMR8-5 (Abcam, Cambridge, UK) ont été dilués à la concentration finale de 1:100 in PBS/ 1% BSA/0.1% Triton. L'intensité du marquage a été analysée en utilisant le logiciel NIH ImageJ pour des quantifications en pourcentage du marquage de surface dans la couche trophoblastique au grossissement 20x d'un microscope équipé d'une caméra DC 300F (digital module R, IM 1000) (Leica).

Pour l'étude portant sur les membranes fœtales en cas d'endométriose :

Les anticorps monoclonal de souris anti-Cytokeratin 7 (clone OV-TL 12/30, Dako, Glostrup, DK), de souris anti-Vimentine (clone V-9, Dako), polyclonaux de lapin anti-récepteur aux estrogènes (ER) (18-0174, Invitrogen, St Aubin, France), et monoclonal de souris anti récepteur à la progestérone (PR) (clone PgR 636, Dako) ont été utilisés pour caractériser: i) les couches des membranes fœtales ; l'amnios et la decidue étant Vimentine +; le chorion, cytokeratine +, ii) le composant stromal et épithélial, Cytokeratine + and Vimentine + respectivement, et iii) les cellules exprimant les récepteurs aux stéroïdes sexuels, ER+/- et/ou PR+/-, pour définir les structures ressemblant à des lésions d'endométriose. Afin de valider les observations issues de l'analyse génomiques, des sections de tissus ont été incubées pendant 12h avec des anticorps primaires incluant les anticorps polyclonaux de la lapin anti-cMyc (GE10, SantaCruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), polyclonal de lapin anti-cJun (68A2, Cell signaling technologies, Danvers, MA, USA), monoclonal de souris anti-C20 (L26, Bioprime, Kronshagen, Germany), monoclonal de souris anti-CD31 (clone JC/70A, Dako) et polyclonal de lapin anti-BDNF (SC-546, SantaCruz Biotechnology). L'immuno-réactivité a été révélée en utilisant le polymère Novolink en respectant les consignes du fabricant (Leica, Nanterre, France).

2.10 Microscopie électronique

Les tissus ont été fixés dans du paraformaldéhyde 4% - glutaraldéhyde 2% préparés dans du tampon Sorensen. Après trois lavages dans du tampon Sorensen additionné de BSA 1%, les membranes fœtales ont été fixées dans 1% tetroxide d'osmium dans un tampon phosphate 0.1M et puis déshydratées dans des solutions de concentration croissante d'éthanol (70%, 90%, et 100%). Après 10 min d'incubation dans un mélange 1/2 de propane d'époxy et de résine d'époxy, les échantillons ont été inclus dans des capsules de gélatine avec un mélange fraîchement préparé de résine d'époxy et polymérisé à 60°C pendant 24h. Les échantillons ont été montés sur des blocs permettant de réaliser des sections de 90 nm à l'ultra-microtome (Reichert ultracut S), marqués avec de l'acétate d'uranyle et du citrate de Reynold's et observés au microscope électronique à transmission d'électron, (Philips CM10).

2.11 Analyse statistique

Toutes les données ont été analysées en utilisant le logiciel Prism 6 (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA). Nous avons utilisé le test t de Student pour les variables quantitatives et le test de chi deux de Pearson ou le test exact de Fisher pour les variables qualitatives. Les tests non paramétriques ont été utilisés pour les variables qui ne respectaient pas une distribution normale. Les moyennes sont données \pm déviation standard ou si indiqué en écart standard à la moyenne ; $p < 0.05$ a été considéré comme significatif.

3 ARTICLE 1

**LOCAL LOSS OF MATERNAL-FETAL TOLERANCE PRECEDES
PARTURITION IN HUMANS**

Plusieurs semaines avant la mise en route du travail, surviennent des modifications du tissu conjonctif qui aboutissent à la formation du segment inférieur, à la maturation cervicale et à un remodelage focal de membranes fœtales [183]. Ces changements sont en relation avec des modifications biochimiques des propriétés de la MEC et sont intimement liés aux processus qui sont à l'origine de la parturition. Il a été décrit que les membranes fœtales à terme situées en regard du col de l'utérus sont le siège d'une faiblesse physique focale appelée zone de morphologie altérée – ZAM. A distance de cette zone, la morphologie des membranes fœtales n'est pas modifiée et est appelée Zone de Morphologie intacte – ZIM [181, 182].

Faisant suite aux descriptions initiales de McLaren *et coll.* [182] les travaux d'El Khwad *et coll.* ont permis de corréler le remodelage de la MEC et l'amincissement des couches cellulaires à l'affaiblissement physique de cette zone avant le travail et après 37 SA [269]. Ces études soutenaient l'idée qu'il existe un déterminisme et une programmation de la rupture des membranes fœtales dans cette région. En 2010, Nhan-Chang *et coll.* [270] avaient comparé les transcriptomes d'échantillons de choriocidua obtenus sur le site de rupture par rapport à une zone intacte de membranes fœtales après un accouchement par les voies naturelles, au décours d'un travail spontané. L'analyse avait révélé que 677 gènes étaient différenciellement exprimés dans la choriocidua du site de rupture par rapport à une zone de morphologie intacte, alors qu'aucun changement significatif n'est observé dans l'amnios. Ces observations ont confirmé la nature biochimique de la rupture des membranes qui est directement liée aux modifications de la MEC de la choriocidua en accord avec la séquence d'événements du processus de rupture : i) dissociation du chorion de l'amnios, ii) choriocidua fracture, iii) une hernie de l'amnios, iv) la rupture physique de l'amnios qui atteint sa limite élastique intrinsèque [180].

Dans ce travail nous faisons l'hypothèse qu'il existe des modifications biologiques spécifiques qui façonnent les modifications de structure de la ZIM en ZAM et qui participeraient à l'initiation de la parturition. Nous avons voulu étudier les variations moléculaires qu'il peut exister au sein de la choriodecidue entre les régions recouvrant le col et à distance avant le travail à terme et avant terme.

La comparaison des transcriptomes a permis de montrer qu'il existait un ensemble de gènes différentiellement exprimés entre la ZIM et la ZAM. La caractérisation globale par une analyse sans *a priori* des variations d'expression des gènes dans cette zone, à terme avant travail, mais également à partir de 28 SA, a permis de proposer une description longitudinale de la formation de la ZAM et d'interpréter une signature unique d'expression génique, après 37 SA, et avant la mise en route du travail. Par ailleurs, dans notre étude, près de 40 % de gènes exprimés de manière différentielle avant travail dans la ZAM sont également exprimés de manière différentielle après travail. Les voies activées avant et après travail sont similaires à celles liées aux modifications de la MEC, à l'activation de processus de réaction de greffon versus hôte, à l'activation des lymphocytes NK, alors que seules les voies impliquées dans un remaniement extrême de la matrice associé à la formation d'ampoule et de l'IL-6 sont dérégulées après l'accouchement, signes d'une inflammation aiguë. Ainsi, l'analyse ontologique a permis de distinguer des événements temporels survenant dans la choriodecidue recouvrant le col qui précèdent la rupture spontanée des membranes avant travail à terme, et qui persistent ensuite. Ils incluent une activation lymphocytaire qui participe à un processus local de rejet de l'allogreffé fœtale et qui déclenchent une «tempête cytokinique» associé à un profond remaniement tissulaire.

Ces résultats ont été confirmés par des analyses de cytométrie de flux qui mettent en évidence une activation locale des cellules NK déciduales et un changement des macrophages tolérogènes vers un phénotype phagocytaire. Nous avons également montré que ces

modifications de phénotype des lymphocytes NK et des macrophages déciduaux, étaient concomitantes à une transition d'expression des antigènes HLA à la surface du trophoblaste, avec la disparition d'une forme peu polymorphe d'HLA non classique, HLA-F, et la présentation de molécules très polymorphes d'HLA classiques, HLA-A, B et C. Par ces résultats, nous montrons que les trophoblastes se dévoilent (d'un point de vu immunologique) et apparaissent comme du non-soi pour les cellules immunitaires déciduales maternelles. Ces observations suggèrent qu'une activation du système immunitaire maternel participe à une forme de « rejet » où, localement, à la fin de la grossesse, survient une rupture de la tolérance immunitaire maternelle pour les trophoblastes fœtaux, qui pourrait avoir pour conséquence l'initiation de la parturition.

Alors qu'il est classiquement admis que la naissance est le fruit d'une activation inflammatoire intra-utérine avec une libération massive de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-6 ou TNF- α , ou de molécules utéro-toniques, comme les prostaglandines PGE2 et PGF2a ou l'ocytocine, et l'afflux des leucocytes maternels [204], par cette étude, nous démontrons qu'il existe une perte locale de la tolérance materno-fœtale dans la chorioidécidue qui recouvre le col, au sein du futur site présumé de la rupture spontanée des membranes fœtales à terme.

Focal maternal-fetal tolerance loss at the onset of human parturition

Louis Marcellin^{1, 2, 3, 4, 5, 6}, Thomas Schmitz^{7, 8, 9, 10}, Meriem Messaoudene^{1, 2, 3}, Driss Chader¹¹, Christophe Parizot^{11, 12}, Sébastien Jacques^{1, 2, 3}, Jérémy Delaire^{1, 2, 3}, Jean Gogusev^{1, 2, 3, 5}, Alain Schmitt^{1, 2, 3}, Corinne Lesaffre^{1, 2, 3}, Michelle Breuiller-Fouché^{1, 2, 3, 5}, Anne Caignard^{1, 2, 3}, Daniel Vaiman^{1, 2, 3, 5}, François Goffinet^{3, 4, 5}, Dominique Cabrol^{3, 4, 5}, Guy Gorochov^{11, 12, 13}, and Céline Méhats^{1, 2, 3, 5, *}

Affiliations:

¹ Inserm, U1016, Institut Cochin, Paris, France.

² CNRS, UMR8104, Paris, France.

³ Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, Paris, France.

⁴ AP-HP, Maternité Port Royal, Service de Gynécologie Obstétrique I, Paris, France.

⁵ DHU Risques et grossesse, Maternité Port-Royal, Paris, France.

⁶ AP-HP, Maternité Port Royal, Service de Gynécologie Obstétrique II et Médecine de la Reproduction, 75014, Paris, France.

⁷ AP-HP, Hôpital Robert Debré, Service de Gynécologie Obstétrique, Paris, France.

⁸ Université Paris Diderot, Faculté de Médecine, Paris, France.

⁹ Inserm U1141, Paris, France

¹⁰ DHU Protect, Hôpital Robert Debré, Paris, France

¹¹ Inserm, U1135, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI-Paris), Paris, France.

¹² AP-HP, Groupement Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Département d'immunologie, Paris, France.

¹³ Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, CR7, CIMI-Paris, Paris, France.

* Correspondence to: Céline Méhats,

Institut Cochin

Inserm U1016

24 rue du Faubourg St Jacques

75014 Paris, France

tel: 33 1 44 41 23 19

fax: 33 1 44 41 23 02

celine.mehats@inserm.fr.

Conflict of interest statement: The authors have declared that no conflict of interest exists

Abstract

Although maternal-fetal tolerance is essential to allow not only implantation, but also maintenance of the developing embryo, parturition is currently viewed as an intrauterine outbreak of inflammation, accompanied by the massive release of pro-inflammatory cytokines at the maternal-fetal interface. This interface comprises the placenta and fetal membranes. At term, fetal membranes overlying the cervix, the future site of rupture, show altered morphology (Zone of Altered Morphology – ZAM). These biochemical alterations occur in normal fetal membranes during late pregnancy, in preparation for labor. Here, we show that maternal-fetal tolerance is lost in human fetal membranes only at term, and only in the ZAM, overlying the cervix. Just before labor, highly polymorphic HLA-A,-B, and -C determinants of fetal origin are selectively exposed in ZAM to the maternal immune system. The induction of a graft rejection-like program then occurs in ZAM involving i) the activation of cytotoxic decidual NK cells, and ii) the transition of decidual macrophages from an immunotolerant M2-like toward a phagocytic M1-like phenotype. Acute inflammation takes place only after the immune modifications described above. Altogether, our results strongly argue in favor of a breach in local materno-fetal tolerance at the onset of parturition.

Introduction

The mechanisms underlying the onset of parturition remain elusive in humans (1-3). Weeks before delivery, connective tissue becomes increasingly compliant, leading to the development of the lower uterine segment, cervical ripening, and focal remodeling of the fetal membranes (amnion and chorion) (4). At term, fetal membranes overlying the cervix present physical weaknesses accompanied by the swelling and disruption of connective tissue (this zone is called ZAM, for Zone of Altered Morphology, Figure 1A) (5, 6), whereas other regions located far from the cervix remain unaltered (ZIM, for Zone of Intact Morphology, Figure 1A). Little is known about the biochemical cascade causing these altered properties. A shift from an anti-inflammatory to a pro-inflammatory pathway is currently thought to have a pivotal role in parturition, based on high abundance of inflammatory cytokines and chemokines, high activity of proteases, and degradation of ECM in gestational tissues sampled just after vaginal delivery (3). Inflammation impairs progesterone receptor function and promotes the expression of contraction-associated genes in the myometrium (7), enhances estrogen and progesterone metabolism in the cervix, creating a microenvironment favorable for cervical ripening and dilatation (8), and induces fetal membranes weakening (9). However, in humans, it is unclear how maternal, fetal, and placental signals trigger these inflammatory events in the absence of microbial invasion or intrauterine infection. Here, we demonstrate that maternal-fetal tolerance is lost locally at term exclusively in the ZAM. Indeed, at term and before labor, the ZAM is characterized by immune activation and graft rejection molecular signatures. In this specific region, decidual Natural Killer (dNK) cells become activated and resident macrophages switch from an immunotolerant M2-like phenotype towards activated, phagocytic M1-like, phenotype. This is concomitant with a switch in HLA antigen presentation at the trophoblast membrane surface, in which poorly polymorphic HLA-F molecules are replaced with classical, highly polymorphic, HLA-A, B, and C molecules. Altogether, our findings reveal a pre-parturition unmasking of trophoblasts as non-self entities, associated with the activation of a graft rejection-like program in the ZAM at term before labor that may contribute to or initiate the final inflammation burst seen in parturition and delivery in humans.

Results

The choriodecidua overlying the cervix expresses a specific subset of genes at term

We compared the gene expression profile of choriodecidua overlying the cervix (ZAM) with that located far from the cervix (ZIM), obtained from fetal membranes collected after cesarean section at 28-29 weeks of gestation (early preterm samples -EP-), at 33-34 weeks (moderate preterm samples -MP-), and at Term Not in Labor (TNL samples) (Figure 1A, 1B and Supplementary Table S1). Principal component analysis indicated that the overall variability in gene expression could be summarized by two major components: 1) the F1 (horizontal) axis, which groups all samples clearly because of their common origin (choriodecidua) and 2) the F2 (vertical) axis, which separates unequivocally TNLZAM samples from all other samples (Figure 1C). Unsupervised hierarchical clustering of global gene expression identified two main clusters, separating again TNLZAM samples from all other samples (Figure 1D).

Induction of an early graft rejection-like program and subsequent inflammation

In TNL, 316 genes were significantly differentially expressed between ZAM and ZIM (variation ≥ 2): 94 were up-regulated in ZAM and 222 down-regulated (Figure 2A and Supplementary Table S2). These results are consistent with those of Nhan-Chang and coworkers who investigated gene expression in the choriodecidua at the site of rupture after spontaneous vaginal delivery at term (10), and found 677 genes that were significantly deregulated at term during labor in ZAM (Term In Labor -TIL), most of which were down-regulated (225 up- vs. 452 down-regulated genes). Among them, 124 were deregulated in TNLZAM (39.2% of 316; Pearson's chi-squared test: 906.1, p -value: 4.68×10^{-199}). Much fewer genes were significantly deregulated in ZAM before term than after term: 84 genes were deregulated in moderate preterm ZAM (52 up- vs. 32 down-regulated genes), and only 17 genes in extreme preterm samples (6 up- vs. 11 down-regulated genes, Supplementary Table S3). To validate these expression profiles, we performed RT-qPCR for a series of genes and found a significant correlation (p -value < 0.0001) between these and our microarray data (Supplementary Figure S1).

From the four (EP, MP, TNL, and TIL) gene lists (Figure 2B), we mapped the chronological changes occurring in the choriodecidua overlying the cervix from 28 weeks of gestation to rupture at term. Gene Ontology (GO) analysis showed that ECM-related genes were significantly enriched after 33 weeks of gestation (Figure 2C). Among the 316 genes that were significantly differentially expressed in TNLZAM, most (178) were only deregulated at

that particular moment of pregnancy and had immune system-associated functions, most notably in the control of natural killer (NK) cells, T lymphocytes, lymphocyte activation, and graft rejection. Thus, the transcriptional activation of immunity-related genes was a distinctive feature of TNLZAM. Genes previously implicated in pregnancy or labor complications were significantly enriched among those that were uniquely up-regulated after spontaneous delivery (537). The GO term 'Inflammation' described both the subset of genes that were commonly deregulated in “TNL and TIL”, and those that were deregulated “only in TIL”. A heatmap representation of these inflammation-related genes showed that most were down-regulated either in TNL or in TIL (Figure 2D). Genes deregulated both in “TNL and TIL” and with a fold-change above 4-fold in TIL (27 genes) were mainly related to Graft vs. Host Disease (p -value: 3.63×10^{-8}) and ECM (1.98×10^{-7}). Among the inflammation-related genes deregulated “only in TIL”, eight were overexpressed with a fold-change above 4-fold, including IL-6, TNF and IL-8. This gene set was significantly enriched in genes associated with the inflammatory response (1.98×10^{-12}), response to wounding (1.09×10^{-9}), and acute phase response (5.00×10^{-9}). We confirmed by RT-qPCR that acute inflammation-related genes, such as TNF and IL6, were not up-regulated in TNLZAM (Supplementary Figure S1). Collectively, these observations illustrate that acute inflammation genes are preferentially expressed after labor and delivery.

Activation of NK cells and macrophages in the choriodecidua precedes membrane rupture.

We compared the composition of immune cellular infiltrates in the TNLZAM and TNLZIM (Gating details in Supplementary data Fig. S2) by flow cytometry (FC). The proportion of CD45⁺ leukocytes was significantly lower in the TNLZAM than in the TNLZIM ($6.69 \pm 2.18\%$ vs. $13.48 \pm 2.98\%$, p -value: 0.0078, FC Recapitulative data in Table 1). The proportion of CD45⁺CD3⁺ T cells was lower in TNLZAM than in TNLZIM ($60.55 \pm 3.16\%$ vs. $71.67 \pm 3.95\%$, respectively, p -value: 0.0156), whereas TNLZAM contained a higher proportion of CD45⁺CD3⁻CD56⁺ NK cells ($35.11 \pm 2.17\%$ in TNLZAM vs. $28.23 \pm 3.96\%$ in TNLZIM, p -value: 0.0469) and CD45⁺CD3⁺CD56⁺NKT cells ($8.79 \pm 1.33\%$ in TNLZAM vs. $5.24 \pm 0.94\%$ in TNLZIM, p -value: 0.0156). Among NK cells, the proportion of immature CD56^{bright} CD16⁻ NK cells was significantly lower in TNLZAM than in TNLZIM ($9.63 \pm 2.25\%$ vs. $20.66 \pm 3.19\%$, respectively, p -value: 0.0156, Figure 3Aa); the expression profile of these immature NK cells also differed between TNLZAM and TNLZIM, with those in TNLZAM expressing higher levels of the activating molecule, HLA-DR, and of the chemotactic

receptors CD62L and CXCR3, and lower levels of NKG2D receptors (Figure 3Ab). However, immature dNKs in both the TNLZIM and TNLZAM expressed very high levels of the inhibitory receptors NKG2A on their surface (Table 1). In addition, the TNLZAM contained a higher proportion of mature NK cells than the TNLZIM (CD56^{dim} CD16⁻, 15.19 ± 3.07% vs. 6.69 ± 0.92%, respectively, *p*-value: 0.0078), and cells in TNLZAM strongly expressed NKG2C, the activating receptor of HLA-E, and the activation markers HLA-DR and CD57. The HLA-C specific receptor, CD158b, and chemotactic receptor, CCR7, were also more strongly expressed in TNLZAM than in TNLZIM. Moreover, the proportion of differentiated CD56^{dim} CD16⁺ NK cells expressing the activating DNAM-1 receptor was higher in TNLZAM than in TNLZIM (8.47 ± 0.97% vs. 4.37 ± 0.59%, respectively, *p*-value: 0.0078). We also evaluated the abundance of Regulatory T cells (Tregs) in the total CD4⁺ population, and found that the proportion of neither expanded (e)Tregs nor naive (n) Tregs (11) differed significantly between TNLZAM and TNLZIM (for eTregs: 3.27 ± 0.79% vs. 4.09 ± 0.87%, respectively and for nTregs: 1.66 ± 0.25% vs. 1.28 ± 0.25% of total CD4⁺, respectively; gating information in Supplementary Fig. S3). Finally, we observed that the TNLZAM contained a higher proportion of M1-like, phagocytic, CD40⁺ CD206⁻ CD16⁺ CD11c⁺ macrophages (50.61 ± 7.55% in TNLZAM vs. 33.55 ± 6.65% in the TNLZIM; *p*-value: 0.0098), and a lower proportion of M2-like, immunotolerant, CD68⁺ CD206⁺ macrophages than the TNLZIM (4.52 % ± 1.18 in TNLZAM vs. 9.33 ± 1.74% in TNLZIM; *p*-value: 0.002, Figure 3B). Overall, these data indicate that macrophages and NK cells are activated in TNLZAM, with NK cells in TNLZAM acquiring novel repertoires of activating and chemotactic receptors.

Immune activation is associated with extraplacental trophoblast and ECM damage

We subsequently mapped the cell alterations distinguishing TNLZAM from TNLZIM by performing electron microscopy experiments. TNLZIM contained many lymphocytes close to decidual cells and healthy trophoblasts as well as macrophages adherent to lymphocytes, lymphocytes with compacted chromatin, and resting NK cells (Figure 4A). By contrast, TNLZAM contained complex cell aggregates made up of apoptotic trophoblasts, enlarged vacuolated macrophages, lymphocytes with unpacked chromatin, and vacuolated NK cells (Figure 4B). In addition, the ECM surrounding TNLZIM was dense and well-organized, but that surrounding TNLZAM was diffuse and dispersed.

Exposure to different immunogenic HLA haplotypes at term before labor

We examined the major histocompatibility (MHC) status of fetal cells in TNLZAM and TNLZIM because loss of tolerance may result from the presentation of fetal antigens. Our microarray data indicated that the expression of HLA-F, which exhibits few polymorphisms, was significantly lower in TNLZAM than in TNLZIM (Log2FoldChange: -1.17; *p*-value: 0.04). Immunohistochemistry (IHC) analysis showed that HLA-F was present at the cell surface of trophoblasts in the chorionic layer in EP and MP samples (Figure 5A), and its abundance did not differ significantly according to location. By contrast, surface levels of HLA-F in the chorionic layer were significantly lower (2.5-fold) at term in TNLZAM than in TNLZIM (*p*-value: 0.031). Conversely, classical MHC-I, HLA-A, -B, and -C-staining was low and unchanged in chorionic trophoblasts, as expected in EP and MP samples, but was significantly higher in TNLZAM than in TNLZIM (3.51-fold; *p*-value: 0.016; Figure 5B).

Discussion

McLaren and al. first described the unique morphological changes that occur before labor in a restricted area in fetal membranes located over the cervix (6). These histological alterations comprise a marked disruption of connective tissue and the thinner trophoblast and decidual layers. ECM remodeling and thinning of the cellular layers are associated with a physical weakening of this zone (12), providing strong support to the idea that susceptibility to rupture is developmentally programmed. Here, we show that maternal-fetal tolerance is locally lost at term in the choriodecidua overlying the cervix at the future site of spontaneous membrane rupture.

Through global gene expression and FC analysis, we demonstrate that decidual immune cells are specifically activated at this site. In particular, NK cells and M1-like macrophages become activated, and non-classical MHC HLA-F molecules are replaced with classical, highly polymorphic, HLA-A, -B, and -C molecules at the surface of trophoblasts. We also analyzed the zone located over the cervix at two additional time points; between 28 and 29 weeks and between 33 and 34 weeks of gestation. This enabled us to determine the chronological changes occurring during ZAM induction and to relate this process to a unique immune signature. At the EP stage, only 17 of the ~24,000 human genes analyzed were differently expressed between ZAM and ZIM. Four weeks later into pregnancy, 84 genes, mainly related to ECM, were differentially expressed in the zone overlying the cervix. However, strikingly, at 38-39 weeks of gestation and before labor, more than 300 genes were differentially expressed in this area. In total, 280 of these genes were not deregulated in EPZAM or MPZAM and encode primarily immune markers and molecules involved in the graft rejection process.

Parturition is currently thought to involve the outbreak of intrauterine inflammation accompanied by the massive release of pro-inflammatory cytokines, such as IL-6 and TNF- α , uterotonins, e.g. prostaglandins PGE2 and PGF2 α , and the influx of maternal leukocytes (3). However, these observations are based on comparisons made between gestational tissues obtained after cesarean before labor and those obtained after vaginal delivery, without mention to specific regions within the uterus. Such studies reflect the end of the birth process and provide limited insight into the temporal events triggering parturition and spontaneous labor. Here, we compared matched tissues before labor, thus eliminating inter-individual differences and strengthening our results. Remarkably, the comparison of our results with a list of genes differentially expressed between the site of rupture and an intact zone of the fetal membrane in women who delivered vaginally (10) shows that the expression of genes related

to Graft rejection, NK and lymphocytes, and leukocyte activation precedes the onset of spontaneous labor. Conversely, acute inflammation, illustrated by a 4-fold increase in IL-6, TNF, and PTGS2 expression occurs only after labor onset. Therefore, we propose that inflammation does not trigger human parturition; instead, it may represent a downstream effector mechanism mainly involved in tissue remodeling and clearance of foreign material.

To examine how the transcriptional modifications described above relate to phenotypic and functional consequences, we analyzed the decidual leukocyte infiltrate in matched TNLZIM and TNLZAM samples. Proportion of CD45⁺ cells were lower in TNLZAM than in TNLZIM, arguing against a global influx of leukocytes into the future site of rupture before labor. These findings are consistent with those of Osman et al. who previously investigated leukocyte recruitment in different regions of the fetal membranes by IHC and failed to demonstrate an influx of CD45⁺ leukocytes at term before labor (13). Instead, we found dynamic changes in dNK (CD3⁺CD56⁺) subpopulations before labor, with the TNLZAM containing a higher proportion of CD56^{dim} CD16⁻ and CD16⁺ cells than the TNLZIM. CD56^{bright} dNK cells are the predominant decidual cell population during early pregnancy (14). The abundance of CD56^{bright} NK cells in the decidua was recently reported to increase between the first and second trimester (15). CD56^{bright} NK cells produce large amounts of cytokines, whereas CD56^{dim} NK cells are typically cytotoxic effectors. In early pregnancy, dNKs are crucial for tolerance to the semi-allogenic fetus and for vascular transformation of the uterine spiral arteries (16). In addition, the presence of many CD56^{bright} NK cells through mid-gestation creates an angiogenic and tolerogenic decidual microenvironment, which is necessary for harmonious fetal development. The reactivity of NK cells is controlled by several inhibitory and activating receptors at their surface and by their microenvironment. Here, we report that the cytotoxic activation of dNKs is favored at the end of pregnancy. Indeed, the percentage of CD57⁺ HLA-DR⁺ NKG2C⁺ CCR7⁺ CD56^{dim} CD16⁻ NK cells and DNAM1⁺ CD56^{dim} CD16⁺ NK cells was significantly higher in TNLZAM than in TNLZIM. Acquisition of CD57 signifies a shift toward a high cytotoxic capacity and heightened responsiveness to natural cytotoxicity receptors (17). An increase in HLA-DR presentation, which transmits antigen-related information to T cells, is also an index of activation, whereas DNAM-1 receptors enable functional interaction with macrophages (18). At term, we also observed a skew towards an M1-like activation in ZAM at the expense of CD206⁺ M2-like macrophages. EM images also revealed signs of global leukocyte activation, including cells showing structurally loose chromatin (indicative of active gene transcription) and a heavily vacuolated cytoplasm. Given that our transcriptomic data also

suggested that T cell properties are fine-tuned at term in ZAM, we assessed the balance between conventional and regulatory T cells, the latter of which have an essential role in early pregnancy (19). Tregs, defined according to Miyara *et al.* (11), were scarce in fetal membranes and the Treg/Tconv balance was unchanged between ZAM and ZIM, consistent with data in mice suggesting that Tregs are dispensable in late pregnancy (20).

Intra-uterine maternal-fetal tolerance is essential for successful pregnancy in humans (21). In early pregnancy, stromal cells and leukocyte populations within the decidua accommodate embryo implantation and the remodeling of the uterine environment that establishes the maternal-fetal interface. Trophoblasts present non-classical HLA class Ib molecules which helps them to escape recognition by the maternal immune system. Among these non-classical HLA molecules, HLA-G was the first to be described at the surface of trophoblasts (22) and is one of the most characterized in early pregnancy, along with HLA-E. HLA-F, which has been less studied than HLA-G and HLA-E and presents even fewer polymorphisms, is strongly expressed at the surface of chorionic trophoblasts from midgestation, throughout the last trimester of pregnancy (23). The function of HLA-F is not well understood, although it was recently described to be involved in evading immunosurveillance, tumor cell invasion and metastasis (24). We observed that HLA-F molecules disappear from the trophoblast layer in TNLZAM at term before labor, but continue to be expressed in TNLZIM. Moreover, TNLZAM chorionic trophoblasts start to express classical HLA molecules at their surface. Given the highly polymorphic nature of HLA-A, B, and C molecules and the semi-allogeneicity of trophoblasts, it is very likely that focal exposure of paternal MHC antigens activates decidual lymphocytes near this area. Our transcriptomic analysis revealed no changes in HLA-G or HLA-E expression. However, we found that the balance between inhibitory/activating HLA-E-NK receptors was significantly modified in TNLZAM: the proportion of inhibitory NKG2A+ dNKs was lower in TNLZAM than in TNLZIM and many mature dNKs in TNLZAM expressed activating NKG2C receptors. The binding of NKG2C to HLA-E expressed within this area may account for the cytotoxic NK cell activation profile we observed *in situ*.

The cause behind this focal change in trophoblast phenotype is unknown. Endocrine (progesterone withdrawal, corticotrophin releasing hormone), mechanical factors (uterine stretch) and/or fetal signals have been proposed to control the timing of parturition. Recently, Gao *et al.* provided compelling evidence in mice that the fetus initiates parturition by signaling through at least two factors-SP-A and PAF, derived from the mature fetal lung. An increase in SP-A and PFA concentrations in the amniotic fluid activates fetal macrophages

that migrate to the maternal uterus, inducing inflammation, progesterone withdrawal, and the activation of myometrial contractile genes (25). However, in humans, there is no strong evidence that fetal lung-derived factors act as pro-inflammatory components or promote the migration of fetal macrophages within maternal gestational tissues (26). Further research is needed to decipher the link between maternal/fetal signals and trophoblast phenotype in the onset of parturition.

In conclusion, as normal pregnancy approaches term, chorion trophoblasts overlying the cervix change phenotype and present haplotypes capable of activating maternal immune cells. We propose that this reversal in the tolerogenic status of the maternal-fetal interface highly focalized at the site of membrane rupture, followed by the local unleashing of a graft rejection-like program, represents an early event in human parturition (Figure 6).

Acknowledgements:

We thank Florence Artiguebelle, Charlotte Leterme, Isabelle Avril, Sarah Guettouche, Victoria Buth, and Lauriane Kremer from the CICP 09-01 "Mère-Enfant" of Maternité Port Royal-Cochin for their assistance in recruiting the women and collecting tissues samples, as well as the staff of the Operating Rooms of the Port Royal-Cochin Maternity. We are grateful to Shohreh Azimi of the AP-HP (Département de la Recherche Clinique et du Développement) and Laurence Lecomte-Raclet of the URC Paris Centre Necker-Cochin AP-HP for their help in obtaining institutional legal authorizations to recruit pregnant women and to collect human tissues. We thank Juliette Nectoux for her help with the qPCR experiments, and the staff of the "Genomic", "Histim", EM, and "Cybio" platforms of the Cochin Institute for their help with the transcriptomic, RT-Q PCR, IHC, EM, and, FC experiments. We also thank Emma Walton for editing the English of the manuscript. The study was partly funded by a grant from Assistance Publique – Hôpitaux de Paris. Transcriptomic data reported in the paper are presented in the Supplementary Materials and archived in Gene Expression Omnibus Database (Accession numbers: GSE50900 and GSE59686).

Materials and Methods

Placentas with their attached membranes were collected from: 1) healthy women with an uncomplicated pregnancy, undergoing a planned cesarean delivery at term; and 2) women with a pregnancy complicated by intra-uterine growth restriction, preeclampsia, or chronic retroplacental hematoma, undergoing an emergency cesarean delivery for abnormalities in fetal heart rate between 28-35 weeks of gestation (Supplemental Table S1).

Fetal Membranes overlying the cervical os were marked during surgery with non-traumatic Duval grasping forceps and the macroscopic area of swelling surrounding the forceps was retrieved. The ZAM and the ZIM were collected. Fetal membranes were separated from the placenta in the operating room under sterile conditions. Within 15 min of collection, biological samples were processed in the laboratory. Blood clots were removed by scratching the membranes and rinsing them in phosphate-buffered saline (PBS). Choriondecidua was peeled away from the amnion. Pieces of choriondecidua (EP, MP, and TNL samples) were prepared as appropriate for RNA extraction and IHC experiments. TNLZAM and TNLZIM samples were processed for FC and EM analysis.

Total RNA was isolated using a Qiagen RNeasy Kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions. The purity and concentration of total RNA were first evaluated using a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA), by measuring absorbance at 260 nm, and the samples were then analyzed on a Bioanalyzer System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) to verify their integrity. All samples with an RNA Integrity Number above 6.5 were stored at -80 °C until further processing.

Microarray analysis was conducted on 24 distinct samples divided into pools, with each pool containing three paired sets of choriondecidua samples. Gene expression was assessed by hybridizing the cRNAs to Agilent SurePrint G3 Human GE 8x60K Microarrays (Agilent Technologies), and assessing the fluorescence intensity for the individual oligonucleotide probes. Microarray raw data were imported into R v. 2.15 and analyzed with the BioConductor limma package (27). Among the 62,956 probes present on the microarray, we included the 18,561 unique RefSeq reporters for further analysis. Genes with a nominal p -value ≤ 0.05 were considered to be differentially expressed. Genes showing > 2 -fold variation were further considered in the analysis. The microarray data are archived in Gene Expression Omnibus Database (accession numbers GSE50900 and GSE59686). Hierarchical clustering

and GO terms analysis were performed using the MeV Package (28) and Genomatix GePS (29-31) (release 2.4.0, Genomatix BH, Munich, Germany), respectively.

Quantitative Real-Time PCR

RNA was treated with deoxyribonuclease (Invitrogen, Life Technologies, St Aubin, France) to remove any contaminating DNA, in the presence of RNaseOut (Invitrogen). Four μg of total RNA was reverse transcribed using random primers and M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. A negative control without RNA was included in each series of reverse transcription reactions. A set of genes, including three reference genes (internal controls), was analyzed by quantitative RT-PCR using cDNA synthesized from each sample. Primers for RT-PCR analysis were chosen using PRIMER3 software, based on published sequences (available upon request). Primers were obtained from Eurogentec (Angers, France) and used at 10 nM in the PCR reaction. Quantitative PCR was carried out on a Light Cycler 480, 96 well apparatus (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), with 160 ng of cDNA as a template. We used the amplification kit Light Cycler 480 SYBR Green I Master (Roche), according to the manufacturer's instructions. The efficiency of RT-PCR for all genes was estimated to be $\geq 90\%$. The abundance of each target gene was normalized to that of a set of internal controls, and a "fold change" was determined by the $-2\Delta\Delta\text{Ct}$ formula. The set of internal controls included the geometric mean of three different reference genes, succinate dehydrogenase complex subunit A (SDHA), ribosomal protein large P0 (RPLP0) and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (HNRNPA1). The results were analyzed in LightCycler software using the three fit points method.

Flow cytometry analysis. Cells in the TNLZAM and TNLZIM were dissociated by collagenase B (Roche, Meylan, France) treatment for 45 min at 37°C. For FC analysis, cells were resuspended in 1X PBS (Invitrogen) supplemented with 5% human serum AB (Biowest, Nuaille, France) and incubated for 30 minutes on ice to block nonspecific Fc receptor binding before staining. Cells were then washed and stained for 30 minutes at 4°C with the mAbs diluted in 1X PBS/2% FCS /2 mmol/L EDTA at predetermined optimal concentrations. After the exclusion of dead cells and doublets as described previously (32), NK cells, defined as $\text{CD3}^- \text{CD56}^+$ cells (Pharmingen, Becton Dickinson Biosciences, San Diego, USA) within the CD45^+ (Pharmingen) lymphocyte forward scatter/side scatter (FSC/SSC) subset, were analyzed for the expression of the following markers: NCR (NKp46, NKp30, and NKp44), NKG2D, DNAM-1, and NKG2C (Pharmingen), CD16, CD158a, CD158b, CD158e, and

NKG2A receptors (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA), and CD69, CXCR3, CCR7, and CD62L (Miltenyi Biotech, Paris, France). To identify Tregs, cells were stained with PerCP- or APC-conjugated anti-CD4, PE-, APC- or PC7-conjugated anti-CD25 (Pharmingen), and PC7- or FITC-conjugated anti-CD45RA (Beckman Coulter). Intracellular FoxP3 was detected with PE-conjugated anti-FoxP3 (Clone 236A/E7, e-Bioscience, San Diego, CA, USA) on fixed and permeabilized cells via Cytofix/Cytoperm (e-Bioscience, San Diego, CA, USA) as described previously (33). Macrophages were characterized using CD11c, CD68, CD206, CD14, CD40, and CD16 antibodies (Miltenyi). All data were independently analyzed by two investigators (LM and CM) with FlowJo and GraphPad software.

Transmission electron microscopy. Fetal membranes were fixed in 4% paraformaldehyde-2% glutaraldehyde prepared in Sorensen buffer. After three washes in Sorensen buffer supplemented with 1% BSA, membranes were post-fixed with 1% osmium tetroxide in 0.1 M phosphate buffer and then dehydrated by successive washing in 70, 90, and 100% ethanol. After being incubated for 10 min in a mixture of epoxy propane and epoxy resin (1:2), the samples were embedded in gelatin capsules with freshly prepared epoxy resin and polymerized at 60°C for 24 h. The samples were then mounted in epon blocks and 90 nm semi-thin sections were obtained with an ultramicrotome (Reichert ultracut S). The sections were stained with uranyl acetate and Reynold's lead citrate, and observed under a transmission electron microscope (Philips CM10).

Immunohistochemistry. Tissues were harvested, fixed in 10% formalin, and embedded in paraffin. IHC was performed as described previously (34). Immunoreactivity was detected using the Novolink polymer detection system according to the manufacturer's recommendations (Leica, Nanterre, France). Color was developed using DAB, and tissue sections were counterstained with Mayer's hematoxylin solution (Merck Millipore, Guyancourt, France). Anti-HLA-F antibody, rabbit polyclonal 14670-1-AP (Proteintech, Manchester, UK) and anti-HLA Class 1 ABC, mouse clone EMR8-5 (Abcam, Cambridge, UK), were diluted 1:100 in PBS/ 1% BSA/0.1% Triton. IHC signals were analyzed using NIH ImageJ software to quantify the staining within the chorion trophoblastic layer in a 20x field of view under a microscope equipped with a DC 300F camera (digital module R, IM 1000) (Leica) by two independent investigators (JD and CM).

Statistical analysis

All data were analyzed by Prism 6 software (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA). We used Student's t-test for quantitative variables and Pearson's chi-square or Fisher's exact test for qualitative variables, as appropriate. Non-parametric tests were used for non-normally distributed data. A p -value <0.05 was considered to be significant.

Study approval. The study of the human fetal membranes was approved by the local ethics committee (Comité de Protection des Personnes Ile de France XI, n° 11018, 03/03/2011). All participants provided written informed consent prior to inclusion in the study at the Department of Obstetrics, Port Royal Maternity, Cochin University Hospital, Paris, France.

References

1. Liggins GC, Forster CS, Grieves SA, and Schwartz AL. Control of parturition in man. *Biol Reprod*. 1977;16(1):39-56.
2. Norwitz ER, Robinson JN, and Challis JR. The control of labor. *N Engl J Med*. 1999;341(9):660-666.
3. Romero R, Dey SK, and Fisher SJ. Preterm labor: one syndrome, many causes. *Science*. 2014;345(6198):760-765.
4. Rubens CE, Sadosky Y, Muglia L, Gravett MG, Lackritz E, and Gravett C. Prevention of preterm birth: harnessing science to address the global epidemic. *Sci Transl Med*. 2014;6(262):262sr265.
5. Malak TM, and Bell SC. Structural characteristics of term human fetal membranes: a novel zone of extreme morphological alteration within the rupture site. *Br J Obstet Gynaecol*. 1994;101(5):375-386.
6. McLaren J, Malak TM, and Bell SC. Structural characteristics of term human fetal membranes prior to labour: identification of an area of altered morphology overlying the cervix. *Hum Reprod*. 1999;14(1):237-241.
7. Renthal NE, Williams KC, and Mendelson CR. MicroRNAs--mediators of myometrial contractility during pregnancy and labour. *Nat Rev Endocrinol*. 2013;9(7):391-401.
8. Andersson S, Minjarez D, Yost NP, and Word RA. Estrogen and progesterone metabolism in the cervix during pregnancy and parturition. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(6):2366-2374.
9. Kumar D, Schatz F, Moore RM, Mercer BM, Rangaswamy N, Mansour JM, Lockwood CJ, and Moore JJ. The effects of thrombin and cytokines upon the biomechanics and remodeling of isolated amnion membrane, in vitro. *Placenta*. 2011;32(3):206-213.
10. Nhan-Chang CL, Romero R, Tarca AL, Mittal P, Kusanovic JP, Erez O, Mazaki-Tovi S, Chaiworapongsa T, Hotra J, Than NG, et al. Characterization of the transcriptome of chorioamniotic membranes at the site of rupture in spontaneous labor at term. *Am J Obstet Gynecol*. 2010;202(5):462 e461-441.
11. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, Parizot C, Taflin C, Heike T, Valeyre D, et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*. 2009;30(6):899-911.
12. El Khwad M, Pandey V, Stetzer B, Mercer BM, Kumar D, Moore RM, Fox J, Redline RW, Mansour JM, and Moore JJ. Fetal membranes from term vaginal deliveries have a zone of weakness exhibiting characteristics of apoptosis and remodeling. *J Soc Gynecol Investig*. 2006;13(3):191-195.
13. Osman I, Young A, Jordan F, Greer IA, and Norman JE. Leukocyte density and proinflammatory mediator expression in regional human fetal membranes and decidua before and during labor at term. *J Soc Gynecol Investig*. 2006;13(2):97-103.
14. Chaouat G. Inflammation, NK cells and implantation: friend and foe (the good, the bad and the ugly?): replacing placental viviparity in an evolutionary perspective. *J Reprod Immunol*. 2013;97(1):2-13.
15. Kwan M, Hazan A, Zhang J, Jones RL, Harris LK, Whittle W, Keating S, Dunk CE, and Lye SJ. Dynamic changes in maternal decidual leukocyte populations from first to second trimester gestation. *Placenta*. 2014;35(12):1027-1034.
16. Ratsep MT, Felker AM, Kay VR, Toluoso L, Hofmann AP, and Croy BA. Uterine natural killer cells: supervisors of vasculature construction in early decidua basalis. *Reproduction*. 2014.
17. Lopez-Verges S, Milush JM, Pandey S, York VA, Arakawa-Hoyt J, Pircher H, Norris PJ, Nixon DF, and Lanier LL. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. *Blood*. 2010;116(19):3865-3874.
18. Watzl C. How to trigger a killer: modulation of natural killer cell reactivity on many levels. *Adv Immunol*. 2014;124:137-170.
19. Samstein RM, Josefowicz SZ, Arvey A, Treuting PM, and Rudensky AY. Extrathymic generation of regulatory T cells in placental mammals mitigates maternal-fetal conflict. *Cell*. 2012;150(1):29-38.
20. Shima T, Sasaki Y, Itoh M, Nakashima A, Ishii N, Sugamura K, and Saito S. Regulatory T cells are necessary for implantation and maintenance of early pregnancy but not late pregnancy in allogeneic mice. *J Reprod Immunol*. 2010;85(2):121-129.

21. Arck PC, and Hecher K. Fetomaternal immune cross-talk and its consequences for maternal and offspring's health. *Nat Med.* 2013;19(5):548-556.
22. Kovats S, Main EK, Librach C, Stubblebine M, Fisher SJ, and DeMars R. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science.* 1990;248(4952):220-223.
23. Shobu T, Sageshima N, Tokui H, Omura M, Saito K, Nagatsuka Y, Nakanishi M, Hayashi Y, Hatake K, and Ishitani A. The surface expression of HLA-F on decidual trophoblasts increases from mid to term gestation. *J Reprod Immunol.* 2006;72(1-2):18-32.
24. Xu Y, Han H, Zhang F, Lv S, Li Z, and Fang Z. Lesion human leukocyte antigen-F expression is associated with a poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett.* 2014;9(1):300-304.
25. Gao L, Rabbitt EH, Condon JC, Renthal NE, Johnston JM, Mitsche MA, Chambon P, Xu J, O'Malley BW, and Mendelson CR. Steroid receptor coactivators 1 and 2 mediate fetal-to-maternal signaling that initiates parturition. *J Clin Invest.* 2015;125(7):2808-2824.
26. Reinl EL, and England SK. Fetal-to-maternal signaling to initiate parturition. *J Clin Invest.* 2015;125(7):2569-2571.
27. Ritchie M, Jeremy Silver JW, Natalie, Thorne ML, Egil Ferkingstad, Marcus Davy, Francois Pepin, Dongseok Choi, Davis McCarthy,, and Di Wu AO, Carolyn de Graaf, Yifang Hu, Wei Shi and Belinda Phipson. 2012. limma:
Linear Models for Microarray Data. R.p.v. 3.10.3., editor.
28. Saeed AI, Bhagabati NK, Braisted JC, Liang W, Sharov V, Howe EA, Li J, Thiagarajan M, White JA, and Quackenbush J. TM4 microarray software suite. *Methods Enzymol.* 2006;411:134-193.
29. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, Puigserver P, Carlsson E, Ridderstrale M, Laurila E, et al. PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet.* 2003;34(3):267-273.
30. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(43):15545-15550.
31. Werner T. Bioinformatics applications for pathway analysis of microarray data. *Curr Opin Biotechnol.* 2008;19(1):50-54.
32. Messaoudene M, Fregni G, Fourmentraux-Neves E, Chanal J, Maubec E, Mazouz-Dorval S, Couturaud B, Girod A, Sastre-Garau X, Albert S, et al. Mature cytotoxic CD56(bright)/CD16(+) natural killer cells can infiltrate lymph nodes adjacent to metastatic melanoma. *Cancer Res.* 2014;74(1):81-92.
33. Mathian A, Parizot C, Dorgham K, Trad S, Arnaud L, Larsen M, Miyara M, Hie M, Piette JC, Frances C, et al. Activated and resting regulatory T cell exhaustion concurs with high levels of interleukin-22 expression in systemic sclerosis lesions. *Ann Rheum Dis.* 2012;71(7):1227-1234.
34. Marcellin L, Santulli P, Gogusev J, Lesaffre C, Jacques S, Chapron C, Goffinet F, Vaiman D, and Mehats C. Endometriosis also affects the decidua in contact with the fetal membranes during pregnancy. *Hum Reprod.* 2015;30(2):392-405.

Figure legends

Figure 1- At term, prior to labor, the choriodecidua overlying the cervix presents a unique molecular signature of immune activity and graft rejection-like process.

Figure 1

Marcellin et al. 2015

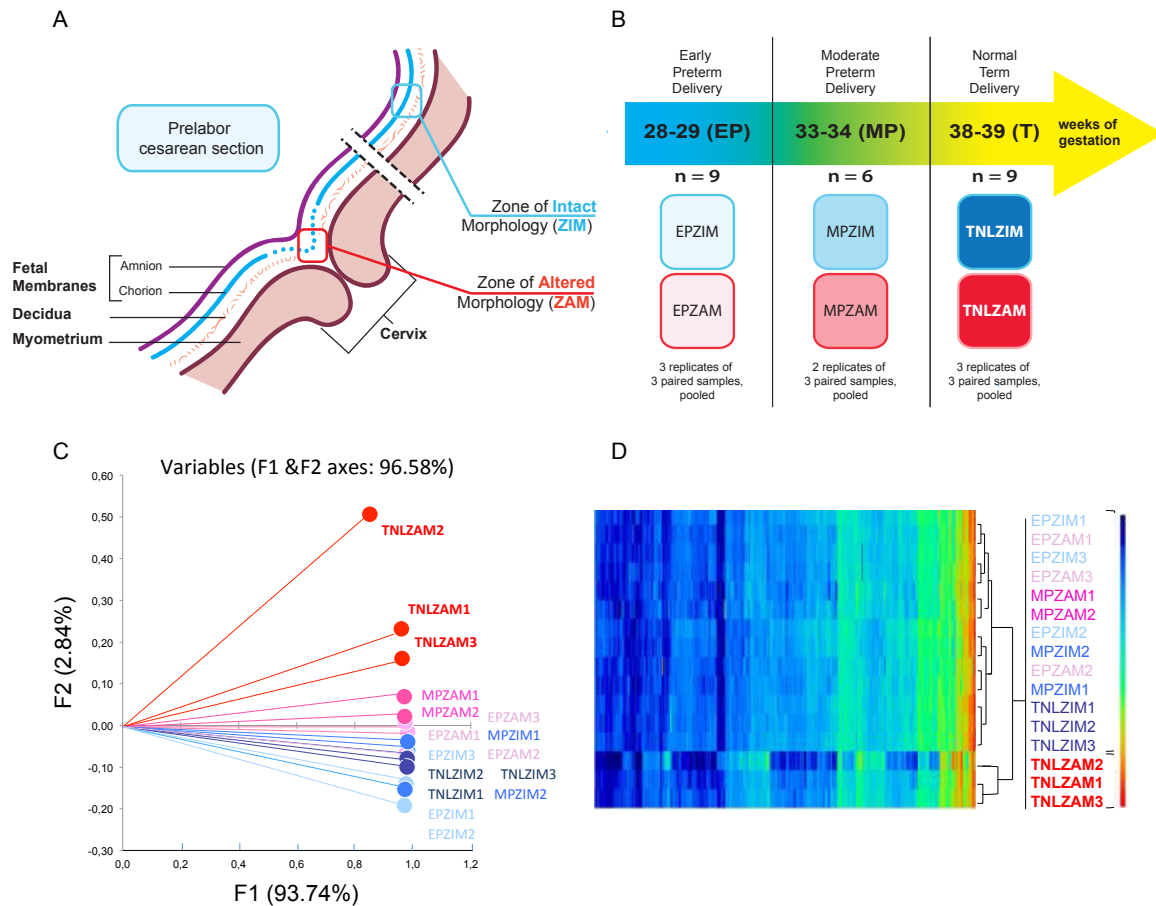


Figure 1- The choriodecidua overlying the cervix at term presents a unique molecular signature.

A) The choriodecidua overlying the cervix (ZAM) and that located far from the cervix (ZIM) was sampled from intact membranes collected from pregnant women undergoing a cesarean section. B) Samples were taken before labor between 28-29 weeks of gestation, an early preterm stage (EP samples), between 33-34 weeks of gestation, a moderate preterm stage (MP samples), and at term before labor (TNL samples). Transcriptomic analysis was performed on biological replicates of paired pooled samples (number indicated in the table). The number of women who were recruited in each group is indicated in the table. C) Principal component analysis of gene expression. Each vector represents a pool of biological replicates. D) Hierarchical clustering of the probes across ZAM and ZIM pools.

Figure 2- A local graft rejection-like process is electively present at the site of subsequent membrane rupture.

Figure 2

Marcellin et al. 2015

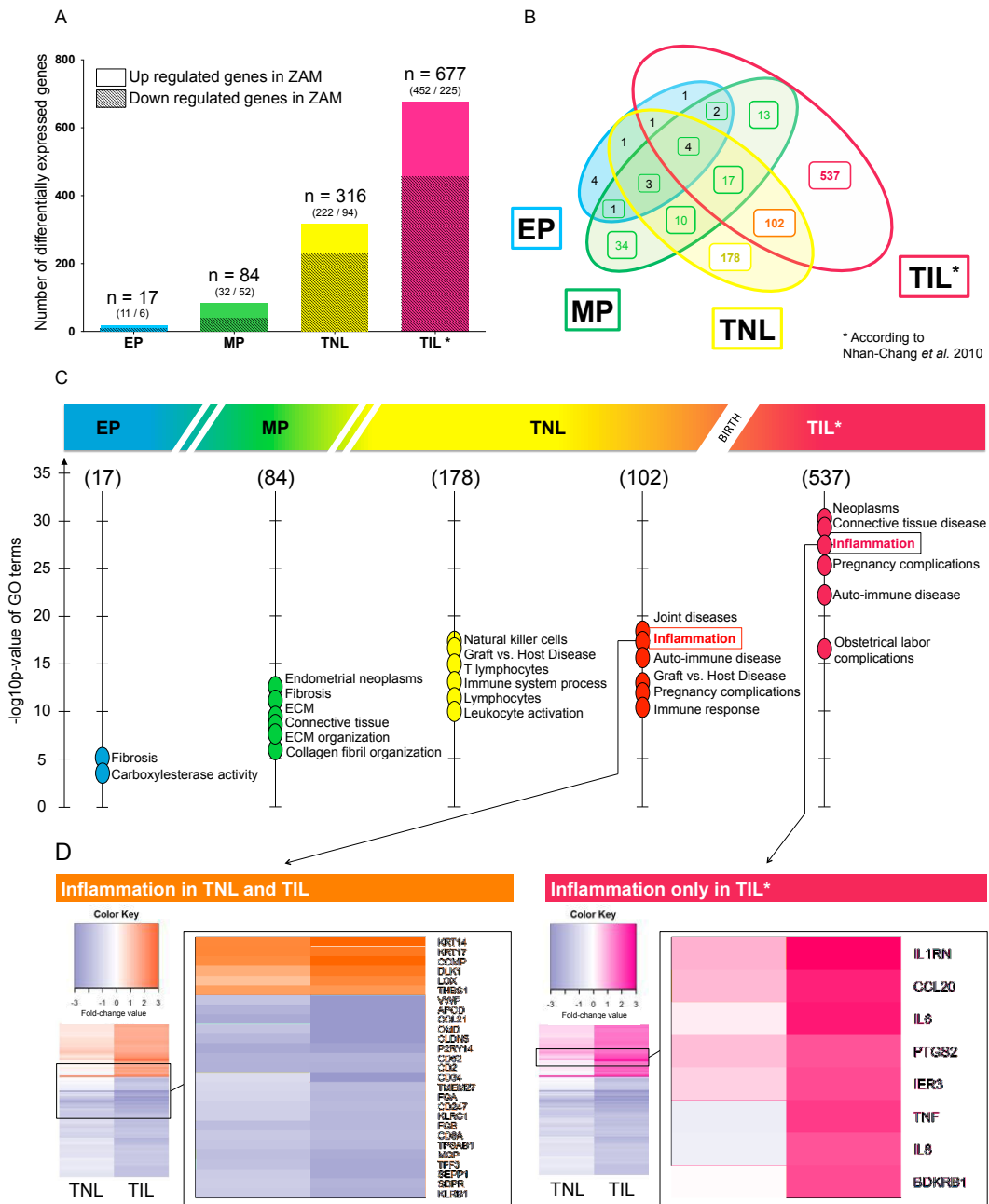


Figure 2- A local graft rejection-like process occurs selectively in TNLZAM.

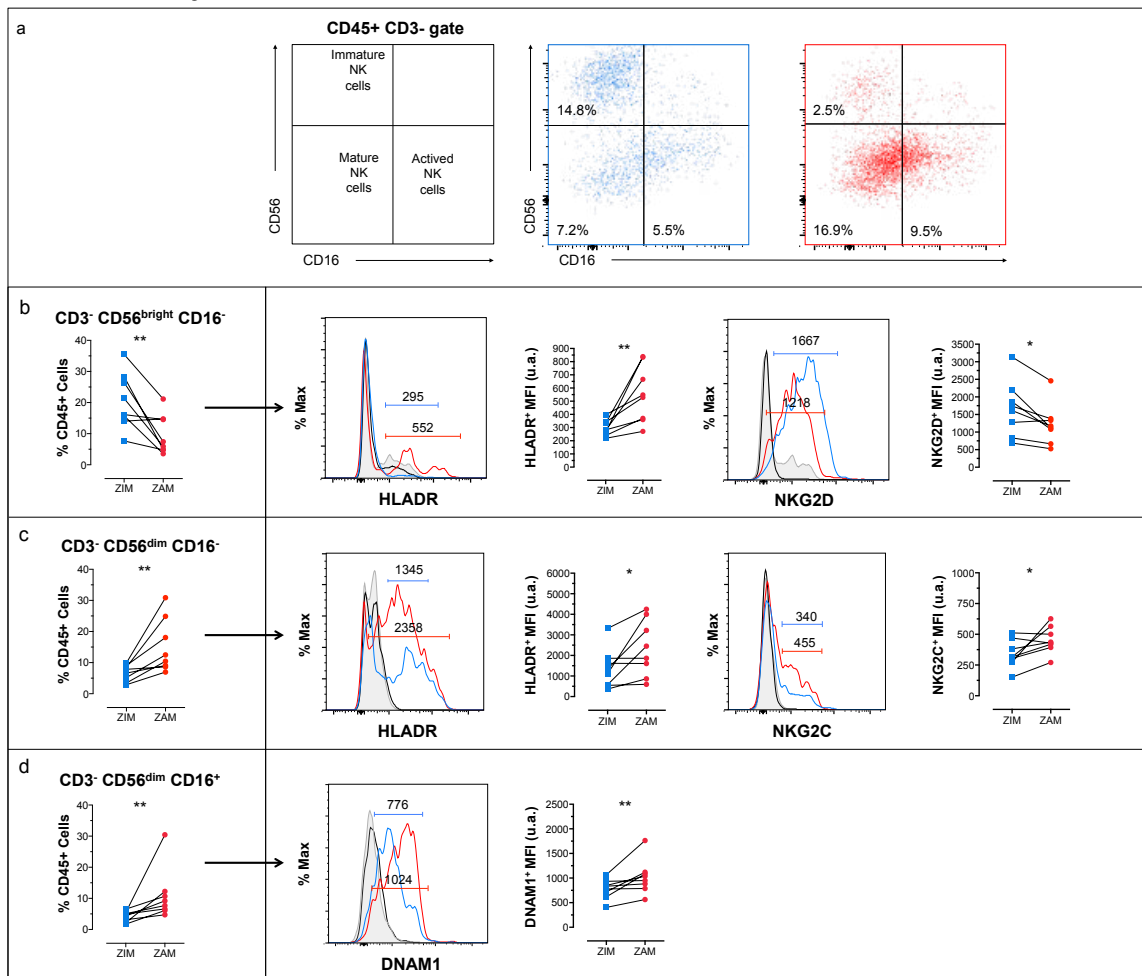
A) Size of the gene lists. The gene expression arrays identified 17 genes differentially expressed between ZAM and ZIM in EP, 84 genes in MP, and 316 in TNL samples. Nhan Chang et al. described 677 genes that were differentially after vaginal delivery (TIL samples). B) A Venn diagram was constructed to compare the four gene lists C) These groups of genes were analyzed for Gene ontology (GO) and sorted based on $-\log_{10}(p\text{-value})$. D) A heatmap representation of the genes related to 'Inflammation' that were differentially expressed either in both TNL and TIL or in TIL.

Figure 3 – NK cells and macrophages in TNLZAM compared to TNLZIM.

Figure 3

Marcellin et al. 2015

A. NK cell analysis



B. Macrophage analysis

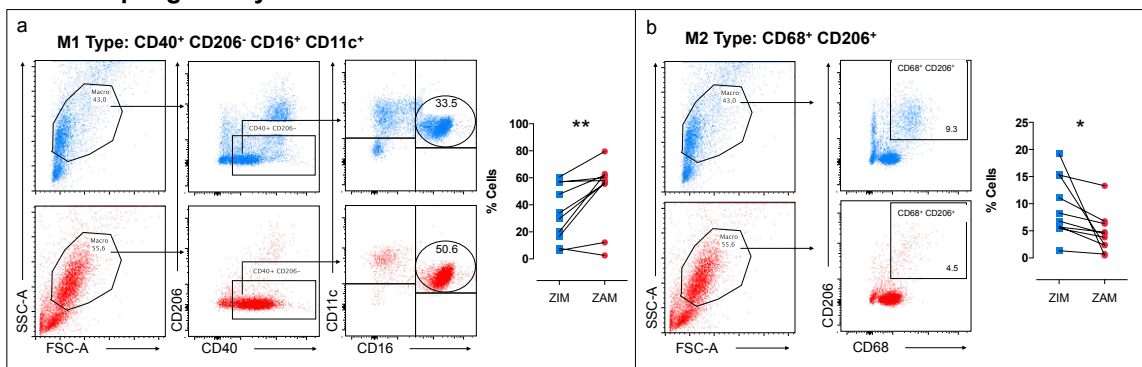


Figure 3 – NK cells and macrophages in TNLZAM and TNLZIM.

ZAM and ZIM cells were dissociated by collagenase treatment and NK cells and macrophages were identified by flow cytometry. A) NK cell analysis: CD56^{bright}-CD16⁻ (a), CD56^{dim}- CD16⁻ (b), and CD56^{dim}- CD16⁺ NK cells (c) Each cell subset is shown as a proportion of the total CD45⁺ population. ZAM- and ZIM-associated cells are color-coded red and blue, respectively, and their negative controls are shown in black and gray, respectively. B) Macrophage analysis: M1-like macrophages (a) and M2-like macrophages (b) frequencies. Plots of eight independent experiments, with paired TNLZAM and TNLZIM. * p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01 (non-parametric Wilcoxon test).

Figure 4 - Electron microscopy pictures of TNLZIM and TNLZAM tissue showing presence of dead trophoblasts and activated leukocytes in choriodecidua overlying the cervix.

Figure 4

Marcellin et al. 2015

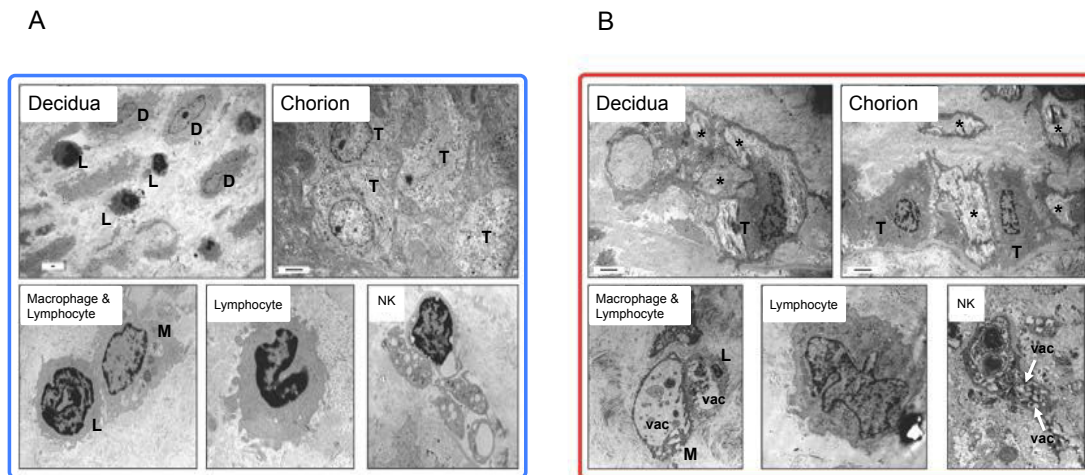


Figure 4 - Electron microscopy pictures of TNLZIM and TNLZAM tissue showing presence of dead trophoblasts and activated leukocytes in choriodecidua overlying the cervix.
 A) TNLZIM, B) Paired TNLZAM. Top: pictures of the decidual and chorionic layer; scale bar, 2 μ m.
 Bottom: Close-up pictures of macrophages and lymphocytes, lymphocytes, and NK cells.

D: decidual cell; L: Lymphocytes; M: Macrophage; T:Trophoblast; *: Dead cell; Vac: Vacuole.
 Representative data of paired TNLZIM and TNLZAM collected from three different women.

Figure 5- Disappearance of non-polymorphic HLA-F molecules and *de novo* expression/presentation of classical highly polymorphic HLA-A, -B, -C on chorionic trophoblasts in TNLZAM.

Figure 5

Marcellin et al. 2015

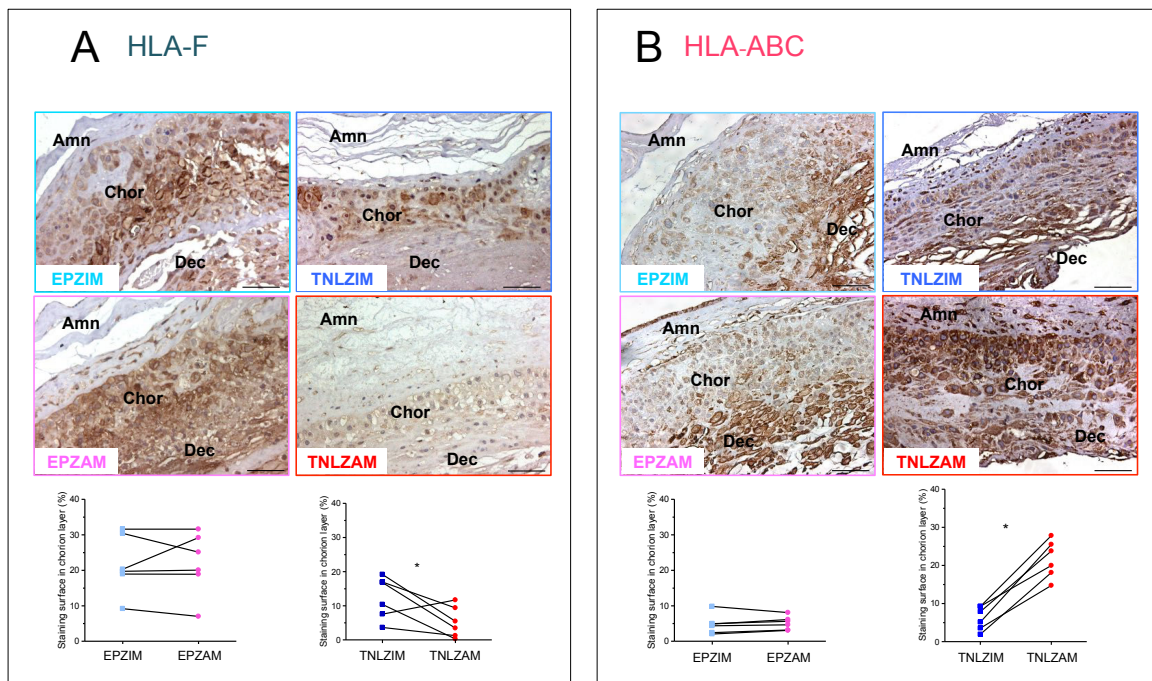


Figure 5- Disappearance of non-polymorphic HLA-F molecules and *de novo* expression/presentation of classical highly polymorphic HLA-A, -B, -C on chorionic trophoblasts in TNLZAM.

A, B) Immunohistochemistry analysis using anti- HLA-F and HLA-A, B, and C antibodies. High-magnification of fetal membrane sections collected from paired EPZIM and EPZAM samples (left panel), and paired TNLZIM and TNLZAM samples (right red panel). Bound antibody was detected with DAB as a chromogen (brown deposits correspond to signal). The data are representative of paired TNLZIM and TNLZAM collected from six different women, and paired EPZIM and EPZAM, MPZIM and MPZAM collected from six different women. Amn) amnion; Chor) chorion; Dec) decidua. Scale bar, 100 μ m. At the bottom, Quantification of staining within the chorionic layer before (EP) and at (TNL) term. * $p \leq 0.05$ (non-parametric Wilcoxon test).

Figure 6- Summary scheme of the cellular modifications that occur in ZAM at the end of pregnancy before the onset of labor, illustrating the (semi-) allograft rejection-like process.

Figure 6

Marcellin et al. 2015

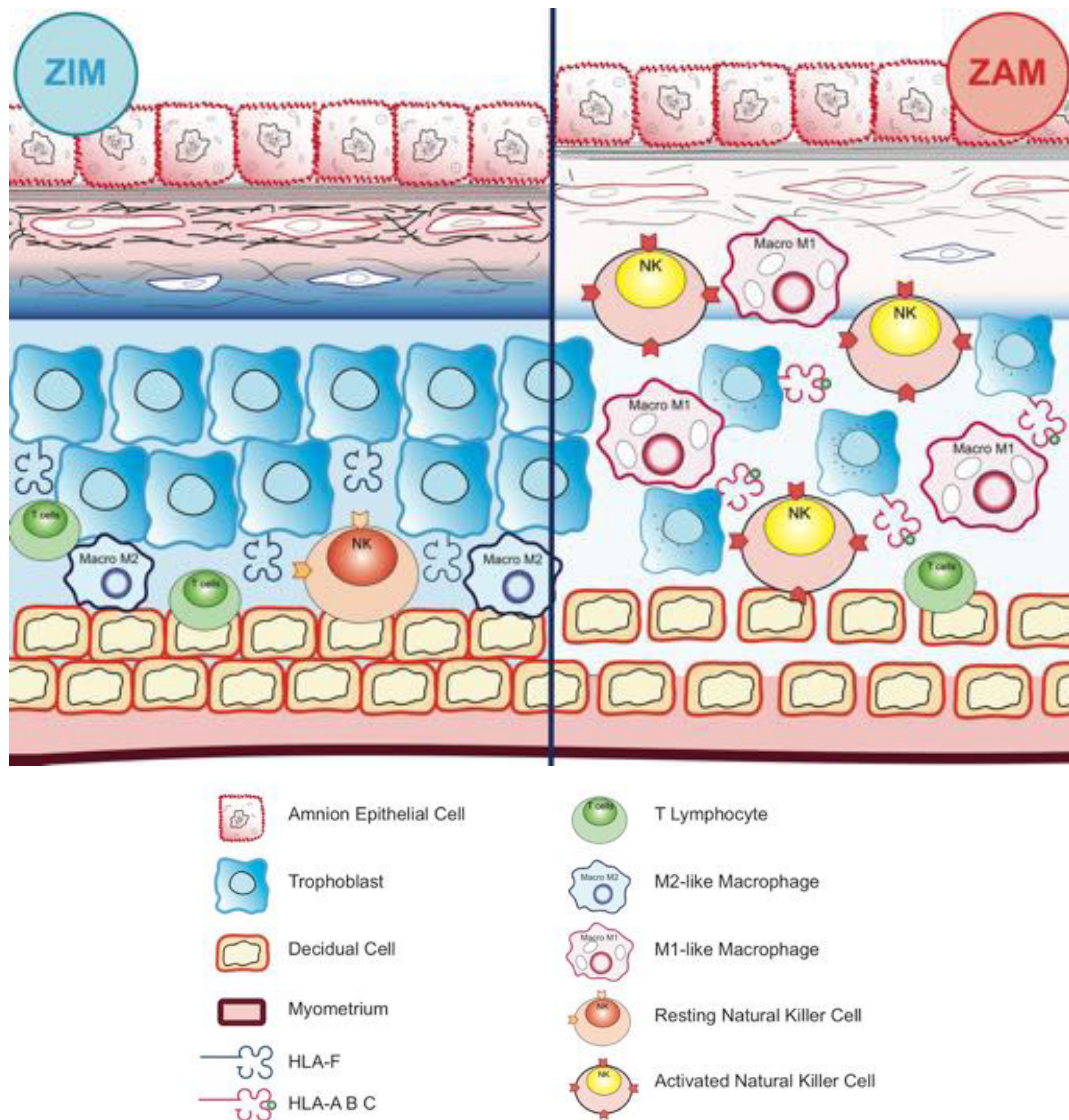


Figure 6- Summary of the cellular modifications that occur in ZAM at the end of pregnancy before the onset of labor, leading to (semi-) allograft rejection-like process. Within the zone of the choriodecidea overlying the cervix at the end of pregnancy, NK cells and macrophages change phenotype, becoming activated and phagocytic, respectively. This causes a local loss of maternal-fetal tolerance and is associated with an increase in the expression of classical HLA-A, B, and C molecules and the disappearance, at the surface of chorionic trophoblasts, of the non-classical HLA-F molecules that exhibit few polymorphisms.

Supplemental legends

Figure S1- RT-qPCR validation of microarray data and comparison to data of Nhan-Chang et al. after spontaneous rupture of membranes and vaginal delivery.

Figure S2- Flow cytometry analyses of T lymphocytes and NK cells demonstrated a global decrease in the frequencies of leukocytes and T lymphocytes and increased frequencies of NK and NKT cells in ZAM vs. ZIM.

Figure S3. Tregs were rare in the late pregnancy choriodecidua and its population frequency did not change in TNLZAM vs .TNLZIM, with no stigmata of activation.

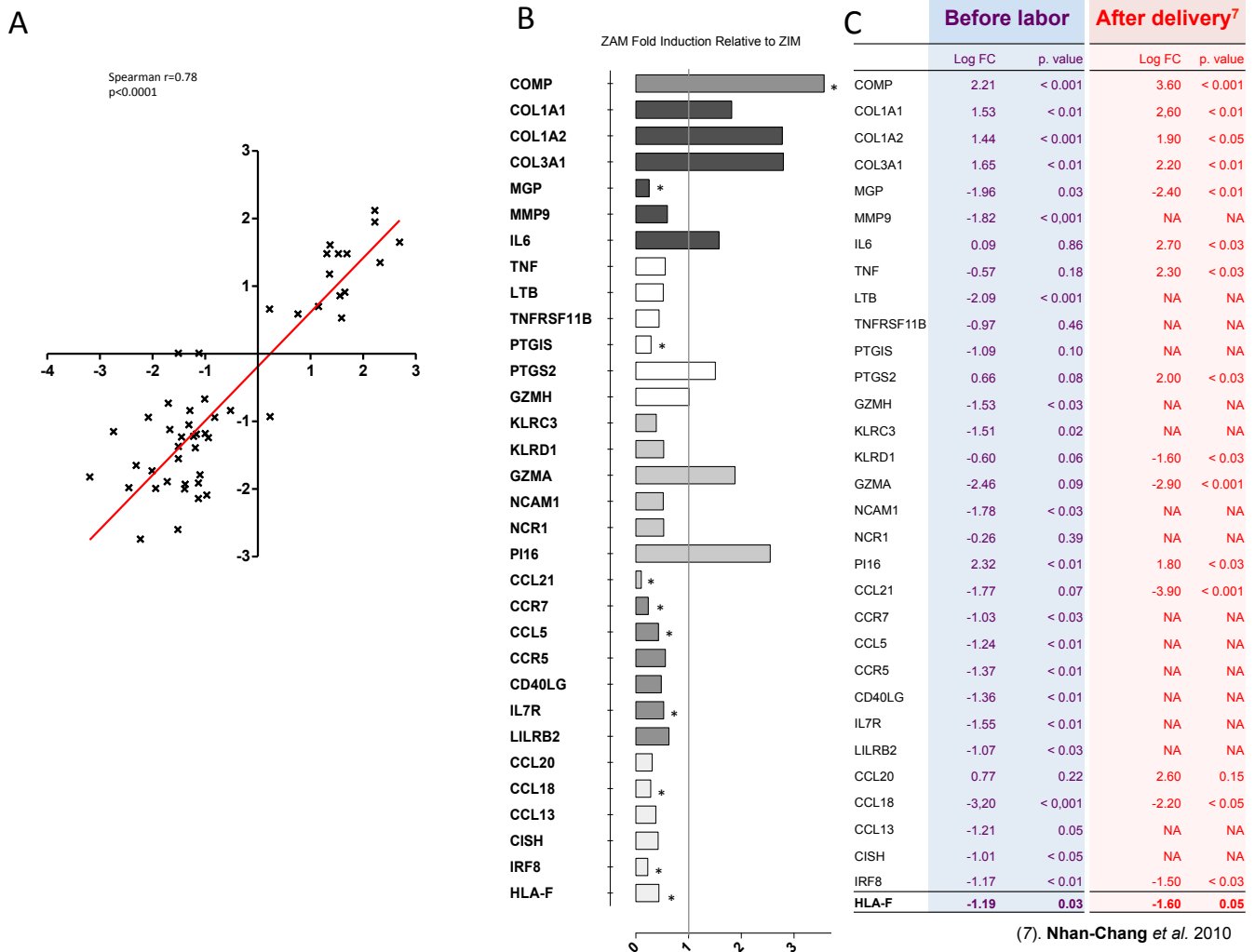
Table S1- Subjects general and obstetrical characteristics.

Table S2- List of the genes differentially expressed in TNLZZ

Table S3- List of the genes differentially expressed in XPZZ and PZZ

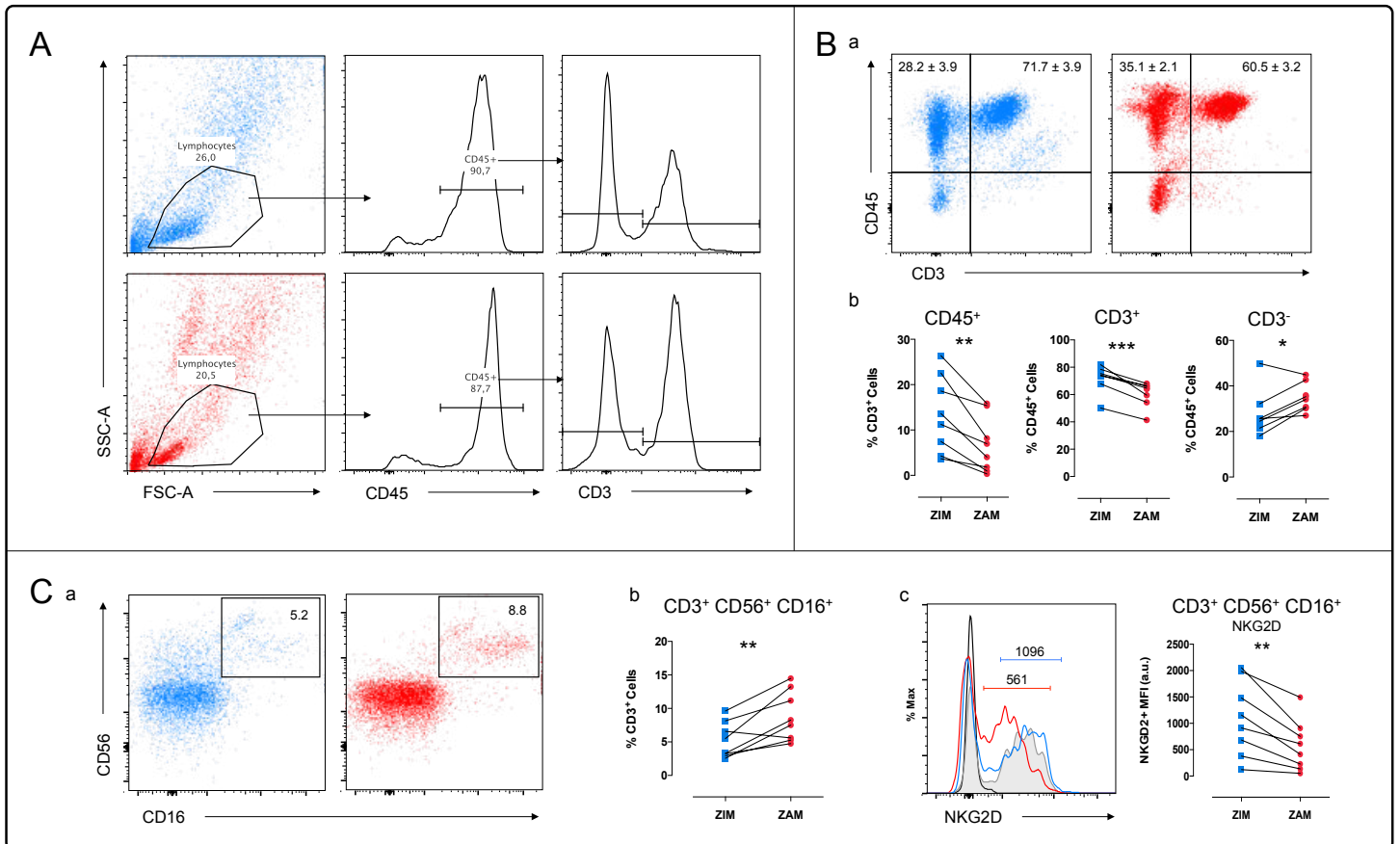
Table S4- Whole data set of Lymphocytes FC analysis.

Figure S1- RT-qPCR validation of microarray data and comparison to data of Nhan-Chang et al. after spontaneous rupture of membranes and vaginal delivery.



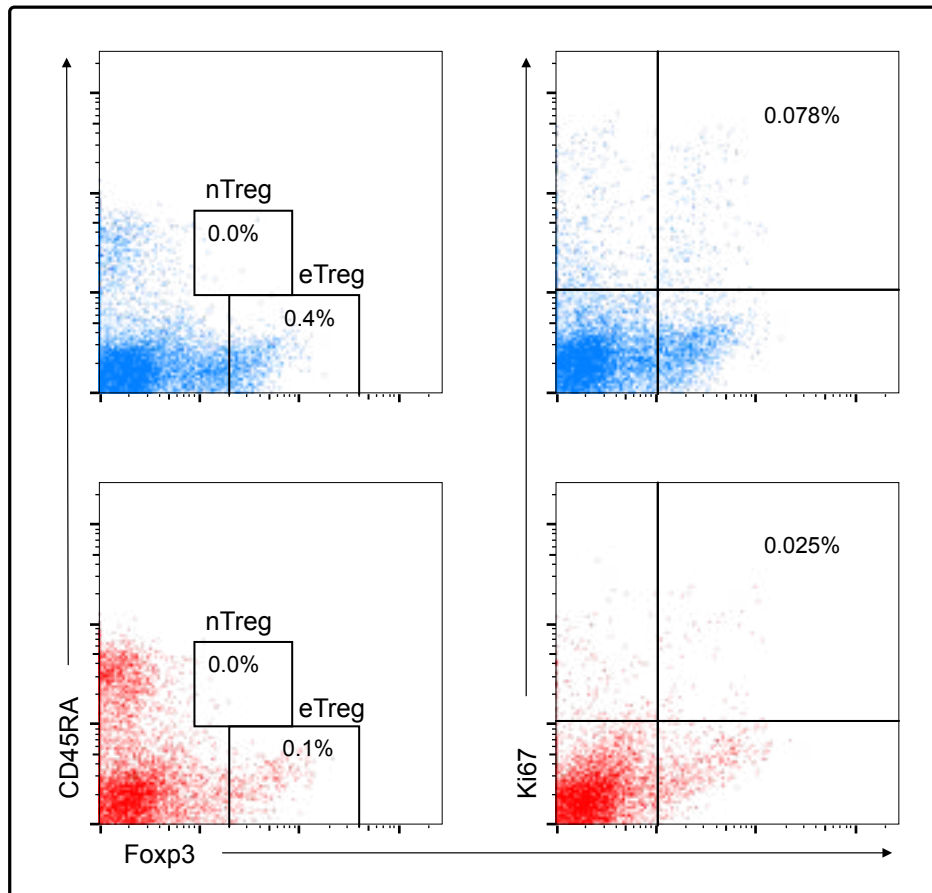
A) Comparison of microarray data to RT-qPCR results of a series of selected genes. Linear correlation between Real-time PCR Log₂(fold change) and transcriptome Log₂(fold change). Fifty genes were tested in XPZZ, PZZ and ZZ samples; Spearman r correlation value and p.value are depicted. B) ZAM vs. ZIM gene relative expression of subsets of genes, signing for extracellular matrix, acute inflammation, and immunity. n = 11; Paired non parametric Wilcoxon' test was applied. *, p.value ≤ 0.05. C) Comparison of the Log₂(fold change) and p.values of our transcriptomic data (Before labor) to the ones of Nhan-Chang study (After delivery) in the subsets of genes tested in the RT-qPCR experiment. NA, data not available.

Figure S2- Flow cytometry analyses of T lymphocytes and NK cells demonstrated a global decrease in the frequencies of leukocytes and T lymphocytes and increased frequencies of NK and NKT cells in ZAM vs. ZIM.



A) Gating strategy used for the measurements of T lymphocytes and NK cells. Lymphocytes were defined based on their forward and side scatter. CD45⁺ cells were gated within the lymphocyte gate and CD3⁺ T cells and CD3⁻ NK cells were gated within the CD45⁺ cells gate. Histograms showed a decrease in CD3⁺ cells and an increase in CD3⁻ cells. B) Representative dot plots showing analysis of defined CD3⁺ T cells and CD3⁻ NK cells and before-and-after graphs showed the differences in cell populations frequencies in TNLZAM vs. TNLZIM. C) CD3⁺ CD56⁺ CD16⁺ NKT cells were gated within the CD45⁺ CD3⁺ gate, a before-and-after graph showed an increased frequency of NKT cells in TNLZAM vs. TNLZIM, and a histogram showed a decreased expression of NKG2D receptors at their surface. In blue, data of TNLZIM; in red, data of TNLZAM. Representative data of independent experiments with dispersed chorionic decidua from eight patients. Paired non parametric Wilcoxon' test was applied. *, p.values ≤ 0.05; **, p.values ≤ 0.01; ***, p.values ≤ 0.001.

Figure S3. Tregs were rare in the late pregnancy choriodecidua and its population frequency did not change in TNLZAM vs .TNLZIM, with no stigmata of activation.



Lymphocytes were defined based on their forward and side scatter. CD4⁺ cells were gated within the lymphocyte gate. FoxP3⁺ CD45RA^{+/-} cells were gated within the CD4⁺ gate. FoxP3⁺ Ki67^{+/-} cells were gated within the CD4⁺ gate. nTreg and eTreg were gated within the the FoxP3⁺ CD45RA⁺ gate. In red, data of ZAM. Representative data of independent experiments with dispersed choriodecidual cells from eleven patients. Paired non parametric Wilcoxon' test was applied.

Tregs population frequency did not change in TNLZAM vs. TNLZIM. Lymphocytes were defined based on their forward and side scatter. CD4⁺ cells were gated within the lymphocyte gate. FoxP3⁺ CD45RA^{+/-} cells were gated within the CD4⁺ gate. Naive (n) Treg and expanded (e) Treg were gated within the FoxP3⁺ CD45RA⁺ gate. In blue data of TNLZIM; in red, data of TNLZAM. Representative data of independent experiments with dispersed choriodecidual cells from eleven patients.

Table S1- Subjects general and obstetrical characteristics.

	Term samples (TNLZZ)				Preterm Samples	
	Microarray	RT-qPCR	FC uNK IHC, and ME	FC T cells/macrophages	EPZZ	MPZZ
	n= 9	n=11 ^a	n=8 ^b	n=11 ^b	Microarray, RT-qPCR, IHC n=9	n=6
Age	34.0 (32.5-38.5)	36.4 (33.7-37.8)	32.4 (31.3-34.6)	35.1 (32.6-37.4)	33.7 (28.0–35.0)	31.5 (25.5-33.0)
Gestational age at delivery (Wk)	39.3 (39.1-39.4)	39.1 (38.9-39.3)	39.0 (39.0-39.1)	39.0 (38.7-39.2)	29.4 (28.0–29.9)	33.5 (33.0–33.8)
Caucasian (%)	55.6	72.7	75	45.5	55.5	66.6
African	33.3	27.3	25	36.4	44.4	33.3
Other	11.1	0	0	9.0	0	0
Gestivity (n)	3.0 (3.0-3.0)	3.0 (2.0-4.0)	1.5 (1.0-2.0)	2.0 (1.5-4.0)	2.0 (1.0-2.7)	1.5 (1.0-2.0)
Parity (n)	3.0 (1.0-3.0)	2.5 (1.2-3.0)	0 (0-1.0)	1.0 (0-2.0)	0.6 (0-1.0)	0.2 (0-0.0)
Birth weight (g)	3590 (3440-3930)	3600 (3395-4090)	3130 (2820-3410)	3450 (2825-3800)	1059 (904–1095)	1568 (1322–1505)
			Maternal pathology associated with preterm cesarean	IUGR % PE chronic retroplacental hematoma	44.4 55.5 11.1	83.3 16.6 0

Values are expressed as medians (interquartile range) or percentages. IUGR: Intra-Uterine Growth Retardation; PE: Preeclampsia. TNLZZ: Term not labor ZZ. EPZZ early Preterm ZZ. MPZZ: Moderate Preterm ZZ

^a Samples analyzed as individual replicate; among the 11, 9 are common with those analyzed as pool in the initial microarray study.

^b New set of samples, analyzed as individual replicate.

Table S2- List of the genes differentially expressed in TNLZZ

Gene Symbol	Log2 (FC)	P.Value						
PITX2	1.65	0.00004	GPR171	-1.33	0.00491	DSC2	1.16	0.01263
CCL18	-3.19	0.00006	SH2D3C	-1.61	0.00519	HAMP	-1.51	0.01272
ASRGL1	-1.26	0.00012	FXYD4	1.77	0.00546	FAM20A	-1.42	0.01293
KLF17	-1.08	0.00014	IL2RA	-1.11	0.00564	FAM46B	1.24	0.01319
COMP	2.22	0.00016	IL7R	-1.51	0.00568	RPS4Y2	1.14	0.01368
MMP9	-1.70	0.00017	IFI27	-1.12	0.00585	MATN2	1.55	0.01381
CCDC68	-1.28	0.00022	CD5	-1.19	0.00586	SIGLEC6	1.05	0.01390
LTB	-2.08	0.00028	APCDD1L	1.59	0.00587	IGSF6	-1.01	0.01424
COL1A2	1.53	0.00036	SCGB1D4	-1.13	0.00597	HBQ1	1.57	0.01428
ITGA11	1.23	0.00042	C2orf40	-1.04	0.00622	VEGFC	-1.09	0.01429
TNFAIP8L1	-1.13	0.00044	ITGB7	-1.13	0.00626	NFE2	1.01	0.01436
ILDR1	-1.01	0.00050	CYP4B1	-2.07	0.00643	IGFL2	1.71	0.01443
VSTM2L	1.40	0.00052	C1QL1	1.14	0.00646	KRT14	2.31	0.01457
GDF6	1.11	0.00055	ITGBL1	1.72	0.00668	LOX	1.20	0.01491
SLFN5	-1.34	0.00063	FGF	-1.92	0.00669	C4B	-1.96	0.01496
TPSAB1	-1.68	0.00071	MYRIP	-1.25	0.00671	SLCO2B1	-1.36	0.01497
LCK	-1.04	0.00075	LHX6	-1.04	0.00706	EMB	-1.26	0.01529
CD3D	-1.64	0.00085	NCR3	-1.24	0.00719	IFI44	-1.06	0.01586
NLRC3	-1.60	0.00088	SHANK3	-1.13	0.00729	C1QTNF4	-1.08	0.01587
LEF1	-1.36	0.00108	TMEM229B	-1.02	0.00736	ODAM	1.65	0.01673
CPA3	-1.17	0.00108	CD52	-2.25	0.00781	IL33	-1.09	0.01682
COL3A1	1.69	0.00116	SIRPG	-1.08	0.00787	SFN	1.24	0.01685
CD96	-1.19	0.00130	THBS1	1.85	0.00790	IKZF1	-1.17	0.01688
CD6	-1.39	0.00140	CD34	-1.03	0.00800	AREG	1.52	0.01718
COL1A1	1.56	0.00147	CD93	-1.09	0.00822	OMD	-1.74	0.01718
WISP2	1.59	0.00151	ITGB6	1.25	0.00822	AHSP	1.09	0.01732
SDPR	-1.45	0.00162	DSC3	1.26	0.00848	PECAM1	-1.38	0.01774
CD3G	-1.40	0.00169	GYG2	1.23	0.00858	SERPIN5	2.31	0.01779
OPN4	1.00	0.00170	CD247	-1.39	0.00862	STXBP6	1.19	0.01786
PI16	2.32	0.00172	TNFSF14	-1.36	0.00880	MMRN1	-2.22	0.01793
CD8A	-1.60	0.00214	PAGE4	1.25	0.00891	SYNPO2	-1.62	0.01815
TNNT3	1.33	0.00251	SH3RF2	1.23	0.00892	SKAP1	-1.54	0.01826
CCR5	-1.29	0.00259	KRT6C	1.84	0.00921	CCDC3	-1.57	0.01836
CD40LG	-1.31	0.00260	GIMAP5	-1.18	0.00953	FGL2	-1.20	0.01848
ZNF683	-2.17	0.00267	RNF125	-1.15	0.00968	CHGA	-2.74	0.01863
CD2	-2.26	0.00299	IRF8	-1.13	0.00996	BCL2	-1.35	0.01902
KITLG	-1.07	0.00326	C9orf153	-1.30	0.01013	TBC1D10C	-1.63	0.01903
MXRA5	1.28	0.00333	HBA2	2.01	0.01017	KRT6A	1.09	0.01908
C12orf48	-1.11	0.00350	COLEC12	-1.22	0.01028	NFIA	-1.14	0.01909
PDZK1	1.03	0.00356	KRT17	2.33	0.01048	ACE2	-1.07	0.01930
CACNB2	-1.68	0.00358	ELTD1	-1.11	0.01057	HMGA1	1.12	0.01936
IGF2BP1	1.16	0.00363	COL7A1	1.00	0.01068	MMP23B	1.58	0.01939
TRIM58	1.12	0.00367	ATP8A1	-1.02	0.01072	TCL1B	-1.02	0.01950
EGFL6	2.02	0.00368	CCL5	-1.22	0.01075	FABP3	1.45	0.01954
DLK1	1.56	0.00377	TFPI	-1.30	0.01106	PVRIG	-1.62	0.01957
CTHRC1	1.29	0.00377	SECTM1	-1.09	0.01132	LMO2	-1.48	0.01975
MOXD1	1.02	0.00419	RHOJ	-1.16	0.01132	TSHZ2	-1.07	0.01986
XCL1	-2.14	0.00438	EMCN	-1.14	0.01170	PDE2A	-1.35	0.02005
CXCR3	-1.61	0.00446	LRRC17	1.76	0.01170	B3GNT3	1.18	0.02009
TRAF3IP3	-1.10	0.00460	ADAMTS9	-1.65	0.01220	LYVE1	-1.62	0.02039
CYP1B1	-1.72	0.00468	SLIT2	1.49	0.01224	BCO2	-1.28	0.02039
RGSS5	-2.34	0.00483	HBD	2.06	0.01227	NR2F1	-1.13	0.02040
			RPS4Y1	1.15	0.01252	FLI1	-1.13	0.02076
			PF4	1.82	0.01262	TMEM35	-1.74	0.02091

SLIT3	-1.02	0.02105	RGS2	-1.06	0.02974	PDZRN4	-1.10	0.03895
HLA-DQA2	-1.73	0.02118	APOA1	-1.54	0.02974	KRT1	1.19	0.03907
KLRC3	-1.51	0.02163	CRCT1	1.27	0.02986	FASLG	-1.05	0.03924
CXCL12	-1.27	0.02218	CCL13	-1.19	0.02995	PLAT	-1.77	0.03966
C6orf26	-1.03	0.02252	SH2D4A	1.21	0.03021	LILRB5	-1.43	0.03968
ECSCR	-1.62	0.02258	CCL21	-2.46	0.03094	MS4A4A	-1.43	0.03983
PTPN7	-1.13	0.02262	IGDCC3	-1.62	0.03113	MMP15	1.16	0.04009
CLDN5	-2.09	0.02275	VWF	-1.72	0.03114	RADIL	-1.44	0.04036
GIMAP8	-1.23	0.02306	LILRB2	-1.01	0.03138	CFI	-1.71	0.04058
CHODL	-1.12	0.02326	PI15	-1.18	0.03157	TDRD9	1.48	0.04101
RGS9	1.38	0.02328	CYBB	-1.44	0.03159	CTTNBP2	-1.20	0.04102
RASAL3	-1.64	0.02330	PZP	-1.82	0.03165	KCNN4	1.02	0.04127
MUC1	1.29	0.02367	DOCK10	-1.03	0.03191	ARHGAP9	-1.23	0.04139
PDGFRA	-1.32	0.02374	ADCY4	-1.46	0.03194	GOLGA6C	-1.44	0.04153
HLA-DOA	-1.07	0.02376	TGM1	1.65	0.03209	PREX1	-1.08	0.04154
BTN3A2	-1.38	0.02384	GRASP	-1.06	0.03226	HLA-F	-1.17	0.04161
NCAM1	-1.67	0.02387	CCRL1	-1.37	0.03229	NFAM1	-1.03	0.04172
MS4A7	-1.25	0.02387	KCTD4	1.29	0.03246	KLRC1	-1.40	0.04219
SLC45A3	-1.03	0.02391	DPYSL3	1.76	0.03261	KRT80	1.13	0.04257
SLC04A1	1.09	0.02393	TFF3	-1.79	0.03264	COLEC11	-2.04	0.04278
P2RY14	-2.47	0.02399	C5orf4	-1.08	0.03289	NAP1L3	-1.40	0.04284
C3	-2.28	0.02417	PLXNA4	-1.03	0.03290	ST6GAL1	-1.25	0.04402
KCND2	-1.55	0.02431	TNNT1	2.26	0.03320	UBD	-1.99	0.04412
TMEM27	-1.16	0.02465	IGFBP5	-2.92	0.03328	FZD4	-1.13	0.04414
FAM5B	-1.11	0.02469	SEPP1	-1.64	0.03364	TRPC4	-1.56	0.04441
RARRES1	-1.14	0.02479	MGP	-1.94	0.03368	LRRN4CL	-1.68	0.04473
FGA	-1.21	0.02487	REN	-1.89	0.03374	RAB7B	-1.47	0.04498
ITGB2	-1.25	0.02491	C5orf13	1.11	0.03396	SPINK2	-1.78	0.04500
AADAACL2	-3.04	0.02498	AADAC	-2.45	0.03406	LAIR1	-1.01	0.04529
IL1F5	1.12	0.02503	CAMP	-1.64	0.03427	RGS1	-1.44	0.04536
FAM150B	-2.35	0.02539	SLC24A3	-1.74	0.03462	ZBED2	1.67	0.04587
HLA-DRB5	-1.35	0.02594	LAG3	-1.39	0.03490	C1S	-1.31	0.04624
GZMH	-1.51	0.02636	LILRB4	-1.68	0.03501	ULK4	-2.03	0.04637
GIMAP1	-1.44	0.02640	TRPC6	-1.03	0.03504	FGR	-1.03	0.04656
GIMAP7	-1.56	0.02711	HLA-B	-1.11	0.03510	PLEKHH2	-1.57	0.04663
PLCB2	-1.28	0.02722	HLA-DRA	-1.47	0.03523	IL10RA	-1.02	0.04720
C19orf33	1.34	0.02724	CDC7	-1.16	0.03525	TCF4	-1.12	0.04746
LG14	-1.27	0.02729	GDNF	1.03	0.03533	TMCC2	-1.69	0.04752
CA9	1.36	0.02730	CCL14	-1.86	0.03570	HRASLS2	2.43	0.04756
RAB25	1.42	0.02750	PLCL1	-1.76	0.03577	IP6K3	-1.09	0.04758
FAM107A	-1.33	0.02758	CCL27	1.08	0.03653	FAM19A4	-1.08	0.04787
AOX1	-1.71	0.02805	KLRB1	-1.49	0.03658	LMO7	1.37	0.04801
PKP1	1.51	0.02806	CP	-1.35	0.03700	TTC39C	-1.31	0.04809
HLA-DRB4	-1.09	0.02814	GMFG	-1.12	0.03721	APOD	-2.21	0.04843
HLA-DQB1	-1.42	0.02821	TRIM16L	1.06	0.03743	SPARCL1	-1.82	0.04846
GZMK	-1.32	0.02843	LAMC2	1.21	0.03761	PCSK1	-1.02	0.04848
DEFA3	1.37	0.02864	WDR62	1.47	0.03788	LCP2	-1.12	0.04862
TPPP3	2.19	0.02865	SORT1	1.05	0.03816	RSAD2	-1.02	0.04886
SPOCK2	-1.85	0.02894	KIAA1804	-1.08	0.03822	PAPLN	-1.01	0.04952
XAF1	-1.10	0.02935	PPBP	1.62	0.03826	LY6G5C	-1.73	0.04992
ABCA6	-1.01	0.02948	METTL7A	-1.08	0.03840			
DLEC1	-1.39	0.02949	PGBD3	1.02	0.03858			
GJB5	1.60	0.02952	RUNX3	-1.22	0.03880			

Table S3- List of the genes differentially expressed in XPZZ and PZZ

MP ZZ			EP ZZ		
Gene Symbol	Log2 (FC)	P.Value	Gene Symbol	Log2 (FC)	P.Value
CXCL14	-1.93	0.00003	IGFBP6	-1.12	0.00444
GPBAR1	-1.27	0.00019	STAR	-1.00	0.00449
COL3A1	2.71	0.00026	VIT	1.72	0.00469
C5orf13	1.43	0.00028	CYR61	1.61	0.00632
TNNT3	1.15	0.00030	LOC642587	1.97	0.00678
PAEP	-1.58	0.00030	TGFBI	1.07	0.00689
SPOCK2	-1.18	0.00034	FOS	1.00	0.00790
C13orf33	-1.07	0.00047	SPARC	1.22	0.00800
ADAM28	1.17	0.00047	SERPINB11	-1.72	0.00830
COL1A2	2.22	0.00053	CEACAM1	1.23	0.00837
CYP4B1	-1.88	0.00053	GRP	2.14	0.00880
CTHRC1	1.32	0.00054	TNC	1.02	0.00961
NRK	1.25	0.00057	C12orf42	-1.04	0.00962
SYNPO2	-1.16	0.00081	CCL18	-2.31	0.00989
COL1A1	2.69	0.00083	CYP1B1	-1.74	0.01164
ITGBL1	1.14	0.00100	MATN2	1.05	0.01204
BCHE	1.10	0.00116	C4orf26	1.39	0.01210
EGFL6	2.66	0.00127	PPP4R4	1.24	0.01217
TRIM58	1.09	0.00146	AADAC	-2.23	0.01271
PITX2	1.37	0.00154	CYP26A1	1.62	0.01272
COL5A2	1.50	0.00158	KRT23	1.10	0.01306
DPYSL3	1.44	0.00190	RAB7B	-1.04	0.01363
CCRL1	-1.11	0.00198	AREG	1.31	0.01468
OGN	-1.36	0.00208	WISP2	1.15	0.01472
AOX1	-1.07	0.00218	NPPB	1.06	0.01621
LOXL2	1.12	0.00245	APOA1	-1.13	0.01650
LRRN4CL	-1.10	0.00257	CAPN6	1.59	0.01708
NPR3	-1.21	0.00266	TMEM35	-1.07	0.01793
PROK1	-1.06	0.00269	ERP27	1.03	0.01820
CAMP	-1.27	0.00270	NPW	-1.37	0.01880
EXTL1	-1.18	0.00277	CRCT1	1.27	0.02331
SERPINA3	-1.26	0.00278	CLEC3B	-1.36	0.02370
C10orf116	-1.09	0.00343	OXGR1	1.53	0.02582
PTHLH	1.18	0.00368	CHGA	-1.22	0.02960
SIGLEC6	1.57	0.00368	KRT24	1.69	0.03035
EGR1	1.39	0.00370	GLDC	1.02	0.03048
AADACL2	-1.61	0.00399	LPHN3	1.23	0.03074
STMN2	1.15	0.00431	DKK3	1.08	0.03298
NOV	-1.47	0.00437	SERPINB5	1.93	0.03378
			LAMB4	1.44	0.03455
			KCNE4	1.05	0.03972
			PAGE4	1.46	0.04017
			AIM2	1.06	0.04053
			FOSB	1.13	0.04738
			STXBP6	1.04	0.04838

Table S4- Whole data set of Lymphocytes FC analysis.

	TNLZIM		TNLZAM		p.value
	% Cells	MFI	% Cells	MFI	
CD45+	13.48 ± 2.98		6.69 ± 2.18		0.0078
%CD3+	71.67 ± 3.95		60.55 ± 3.16		0.0156
%CD3-	28.23 ± 3.96		35.11 ± 2.17		0.0469
%CD3+ CD56bright CD16+	5.24 ± 0.94		8.79 ± 1.33		0.0156
CD69		1746 ± 603		1175 ± 439	n.s.
HLA-DR		1312 ± 328		1399 ± 222	n.s.
CD57		275 ± 020		331 ± 63	n.s.
NKG2D		1096 ± 250		561 ± 175	0.0078
NKG2C		880 ± 186		429 ± 144	n.s.
NKG2A		925 ± 169		777 ± 184	n.s.
CCR7		924 ± 428		658 ± 234	n.s.
CD62L		1209 ± 594		899 ± 295	n.s.
CXCR3		2052 ± 963		1262 ± 507	n.s.
NKp30		16 ± 6		18 ± 5	n.s.
%CD3- CD56bright CD16-	20.66 ± 3.19		9.63 ± 2.25		0.0156
CD69		1433 ± 289		1604 ± 281	n.s.
HLA-DR		295 ± 21		552 ± 76	0.0078
CD57		275 ± 57		331 ± 63	n.s.
DNAM1		396 ± 34		479 ± 59	n.s.
NKG2D		1667 ± 276		1218 ± 207	0.0156
NKG2C		447 ± 37		530 ± 55	n.s.
NKG2A		14060 ± 1933		10990 ± 1983	n.s.
CD158a		314 ± 31		488 ± 77	n.s.
CD158b		641 ± 203		646 ± 136	n.s.
CCR7		194 ± 19		241 ± 54	n.s.
CD62L		261 ± 17		366 ± 46	0.0313
CXCR3		235 ± 30		353 ± 63	0.0313
NKp30		38 ± 5		33 ± 3	n.s.
%CD3- CD56dim CD16-	6.69 ± 0.92		15.19 ± 3.07		0.0078
CD69		817 ± 218		873 ± 207	n.s.
HLA-DR		1345 ± 339		2358 ± 485	0.0234
CD57		326 ± 33		380 ± 36	0.0391
DNAM1		502 ± 64		636 ± 41	n.s.
NKG2D		461 ± 73		655 ± 208	n.s.
NKG2C		340 ± 40		455 ± 39	0.0391
NKG2A		509 ± 123		436 ± 97	n.s.
CD158a		198 ± 41		294 ± 32	n.s.
CD158b		234 ± 59		296 ± 40	0.0469
CCR7		271 ± 24		307 ± 18	0.0469
CD62L		363 ± 46		418 ± 38	n.s.
CXCR3		519 ± 54		552 ± 79	n.s.
NKp30		523 ± 66		578 ± 82	n.s.
%CD3- CD56dim CD16+	4.37 ± 0.59		8.47 ± 0.97		0.0078
CD69		679 ± 137		660 ± 73	n.s.
HLA-DR		2823 ± 763		3693 ± 1015	n.s.
CD57		558 ± 109		524 ± 58	n.s.
DNAM1		776 ± 72		1024 ± 123	0.0078
NKG2D		579 ± 168		489 ± 105	n.s.
NKG2C		671 ± 103		787 ± 91	n.s.
NKG2A		792 ± 210		827 ± 165	n.s.
CD158a		346 ± 69		407 ± 54	n.s.
CD158b		360 ± 90		423 ± 76	n.s.
CCR7		379 ± 24		331 ± 068	n.s.
CD62L		522 ± 81		710 ± 147	n.s.
CXCR3		577 ± 187		634 ± 122	n.s.
NKp30		965 ± 195		988 ± 167	n.s.

Gating strategies are depicted in Fig. S2. Data are expressed as mean ± sem. n=8. Paired non-parametric Wilcoxon' test was applied; n.s., non significant.

References

1. Liggins, G.C., Forster, C.S., Grieves, S.A., and Schwartz, A.L. 1977. Control of parturition in man. *Biol Reprod* 16:39-56.
2. Norwitz, E.R., Robinson, J.N., and Challis, J.R. 1999. The control of labor. *N Engl J Med* 341:660-666.
3. Romero, R., Dey, S.K., and Fisher, S.J. 2014. Preterm labor: one syndrome, many causes. *Science* 345:760-765.
4. Rubens, C.E., Sadovsky, Y., Muglia, L., Gravett, M.G., Lackritz, E., and Gravett, C. 2014. Prevention of preterm birth: harnessing science to address the global epidemic. *Sci Transl Med* 6:262sr265.
5. Malak, T.M., and Bell, S.C. 1994. Structural characteristics of term human fetal membranes: a novel zone of extreme morphological alteration within the rupture site. *Br J Obstet Gynaecol* 101:375-386.
6. McLaren, J., Malak, T.M., and Bell, S.C. 1999. Structural characteristics of term human fetal membranes prior to labour: identification of an area of altered morphology overlying the cervix. *Hum Reprod* 14:237-241.
7. Renthal, N.E., Williams, K.C., and Mendelson, C.R. 2013. MicroRNAs--mediators of myometrial contractility during pregnancy and labour. *Nat Rev Endocrinol* 9:391-401.
8. !!! INVALID CITATION !!!
9. Miyara, M., Yoshioka, Y., Kitoh, A., Shima, T., Wing, K., Niwa, A., Parizot, C., Taflin, C., Heike, T., Valeyre, D., et al. 2009. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 30:899-911.
10. El Khwad, M., Pandey, V., Stetzer, B., Mercer, B.M., Kumar, D., Moore, R.M., Fox, J., Redline, R.W., Mansour, J.M., and Moore, J.J. 2006. Fetal membranes from term vaginal deliveries have a zone of weakness exhibiting characteristics of apoptosis and remodeling. *J Soc Gynecol Investig* 13:191-195.
11. Nhan-Chang, C.L., Romero, R., Tarca, A.L., Mittal, P., Kusanovic, J.P., Erez, O., Mazaki-Tovi, S., Chaiworapongsa, T., Hotra, J., Than, N.G., et al. 2010. Characterization of the transcriptome of chorioamniotic membranes at the site of rupture in spontaneous labor at term. *Am J Obstet Gynecol* 202:462 e461-441.
12. Osman, I., Young, A., Jordan, F., Greer, I.A., and Norman, J.E. 2006. Leukocyte density and proinflammatory mediator expression in regional human fetal membranes and decidua before and during labor at term. *J Soc Gynecol Investig* 13:97-103.

13. Chaouat, G. 2013. Inflammation, NK cells and implantation: friend and foe (the good, the bad and the ugly?): replacing placental viviparity in an evolutionary perspective. *J Reprod Immunol* 97:2-13.
14. Ratsep, M.T., Felker, A.M., Kay, V.R., Tulusso, L., Hofmann, A.P., and Croy, B.A. 2014. Uterine natural killer cells: supervisors of vasculature construction in early decidua basalis. *Reproduction*.
15. Kwan, M., Hazan, A., Zhang, J., Jones, R.L., Harris, L.K., Whittle, W., Keating, S., Dunk, C.E., and Lye, S.J. 2014. Dynamic changes in maternal decidual leukocyte populations from first to second trimester gestation. *Placenta* 35:1027-1034.
16. Arck, P.C., and Hecher, K. 2013. Fetomaternal immune cross-talk and its consequences for maternal and offspring's health. *Nat Med* 19:548-556.
17. Kovats, S., Main, E.K., Librach, C., Stubblebine, M., Fisher, S.J., and DeMars, R. 1990. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science* 248:220-223.
18. Shobu, T., Sageshima, N., Tokui, H., Omura, M., Saito, K., Nagatsuka, Y., Nakanishi, M., Hayashi, Y., Hatake, K., and Ishitani, A. 2006. The surface expression of HLA-F on decidual trophoblasts increases from mid to term gestation. *J Reprod Immunol* 72:18-32.
19. Xu, Y., Han, H., Zhang, F., Lv, S., Li, Z., and Fang, Z. 2014. Lesion human leukocyte antigen-F expression is associated with a poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett* 9:300-304.
20. Hiby, S.E., Apps, R., Sharkey, A.M., Farrell, L.E., Gardner, L., Mulder, A., Claas, F.H., Walker, J.J., Redman, C.W., Morgan, L., et al. 2010. Maternal activating KIRs protect against human reproductive failure mediated by fetal HLA-C2. *J Clin Invest* 120:4102-4110.
21. Hiby, S.E., Walker, J.J., O'Shaughnessy K, M., Redman, C.W., Carrington, M., Trowsdale, J., and Moffett, A. 2004. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med* 200:957-965.
22. Ritchie, M., Jeremy Silver, J.W., Natalie, Thorne, M.L., Egil Ferkingstad, Marcus Davy, Francois Pepin, Dongseok Choi, Davis McCarthy, and Di Wu, A.O., Carolyn de Graaf, Yifang Hu, Wei Shi and Belinda Phipson. 2012. limma: Linear Models for Microarray Data. R.p.v. 3.10.3., editor.
23. Saeed, A.I., Bhagabati, N.K., Braisted, J.C., Liang, W., Sharov, V., Howe, E.A., Li, J., Thiagarajan, M., White, J.A., and Quackenbush, J. 2006. TM4 microarray software suite. *Methods Enzymol* 411:134-193.
24. Mootha, V.K., Lindgren, C.M., Eriksson, K.F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., Puigserver, P., Carlsson, E., Ridderstrale, M., Laurila, E., et al. 2003. PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 34:267-273.

25. Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., et al. 2005. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:15545-15550.
26. Werner, T. 2008. Bioinformatics applications for pathway analysis of microarray data. *Curr Opin Biotechnol* 19:50-54.
27. Messaoudene, M., Fregni, G., Fourmentraux-Neves, E., Chanal, J., Maubec, E., Mazouz-Dorval, S., Couturaud, B., Girod, A., Sastre-Garau, X., Albert, S., et al. 2014. Mature cytotoxic CD56(bright)/CD16(+) natural killer cells can infiltrate lymph nodes adjacent to metastatic melanoma. *Cancer Res* 74:81-92.
28. Mathian, A., Parizot, C., Dorgham, K., Trad, S., Arnaud, L., Larsen, M., Miyara, M., Hie, M., Piette, J.C., Frances, C., et al. 2012. Activated and resting regulatory T cell exhaustion concurs with high levels of interleukin-22 expression in systemic sclerosis lesions. *Ann Rheum Dis* 71:1227-1234.
29. Marcellin, L., Santulli, P., Gogusev, J., Lesaffre, C., Jacques, S., Chapron, C., Goffinet, F., Vaiman, D., and Mehats, C. 2015. Endometriosis also affects the decidua in contact with the fetal membranes during pregnancy. *Hum Reprod* 30:392-405.

ARTICLE 2

ENDOMETRIOSIS ALSO AFFECTS THE FETAL MEMBRANES DURING PREGNANCY

L'endométriose est décrite comme une pathologie oestrogénodépendante, liée à une résistance de l'action de la progestérone dans l'endomètre [154, 161]. Plusieurs études ont démontré qu'il existait des changements dans l'endomètre eutopique des femmes atteintes d'endométriose [145-147]. Dans des conditions normales, l'endomètre subit une décidualisation pendant la phase sécrétoire du cycle menstruel et qui persiste lorsque de l'implantation du blastocyste se produit. Cette différenciation, sous contrôle de la progestérone, correspond à la transformation de fibroblastes du stroma en des cellules déciduales épithélioïdes-like associée à un afflux massif de cellules immunitaires [23]. Au cours de la grossesse, la décidualisation sert principalement à contrôler l'implantation du *conceptus* et à permettre un développement harmonieux de l'embryon et de ses annexes (ex: placenta et les membranes fœtales), tout en maintenant l'intégrité de l'utérus.

Traditionnellement, la grossesse est considérée comme ayant un effet positif sur l'endométriose et ses symptômes en raison du blocage ovarien responsable d'une anovulation et d'une aménorrhée en raison d'une saturation en hormones stéroïdes [102]. Pourtant les modifications du tissu endométrial en cas d'endométriose sont susceptibles de provoquer différents changements métaboliques, hormonaux, immunitaires et angiogéniques de l'interface materno-fœtale au cours de la grossesse dont l'impact n'est pas connu.

Au cours de la grossesse, la couche chorionique des membranes fœtales forme une large interface d'interaction materno-fœtale où les trophoblastes fœtaux et la décidue maternelle s'entremêlent. Dans le contexte d'endométriose, la question de la capacité inhérente du tissu endométrial eutopique à former des lésions en contact avec un tissu extra-utérins reste ouverte. De ce point de vue, la choriodecidue peut être considérée comme un modèle original *in vivo* permettant d'étudier le comportement des cellules endométriales, au contact des tissus non-utérins, dans un environnement saturé en hormone stéroïdes.

Ici, afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans l'endométriose, nous avons exploré les changements de la choriodecidue chez les femmes atteintes d'endométriose (CDosis) par des études d'histologie, d'IHC, d'analyse génomiques et épigénomiques à haut débit.

Au cours de nos travaux sur la parturition, nous avons observé des lésions nodulaires brunâtres rouges situées dans la couche déciduale des membranes fœtales avec un aspect macroscopique similaire à celle habituellement décrite dans l'endométriose péritonéale [56]. Nous nous sommes rendu compte que les patientes dont provenaient ces membranes fœtales d'un aspect inhabituel étaient de femmes atteintes d'endométriose profonde.

L'analyse histochimique a montré que toutes ces structures sont apparues comme implantées dans la couche déciduale. Les caractéristiques histologiques et immunohistochimiques de la décidue des femmes atteintes d'endométriose ressemblait fortement à l'histologie et aux observations en IHC des lésions d'endométriose, associant des projections épithéliales papillaires, des dépôts fibrinoïdes, une forte immunoréactivité pour la cytokératine et la vimentine des cellules qui tapissent les kystes, et une forte immunoréactivité pour c-Myc, c-Jun, ER et PR pour les cellules du stroma [271]. Les microkystes (MCP), qui sont détectés dans la couche trophoblastique des membranes, sont communément observés dans les conditions normales et ont déjà été décrits comme des lésions associées à une hypoxie placentaire [272]. L'histomorphologie de la glande endométriosique décrite ici dans la choriodécidue était tout à fait différente de celle des MCP.

L'analyse transcriptomique nous a permis de caractériser un profil d'expression génique spécifique de la CDosis. Un sous-ensemble de gènes (commun aux gènes dérégulés dans l'endométriome ovarien provenant de l'analyse transcriptomique de Borghes et *al.*) est lié à l'immunité, le système nerveux, l'endomètre, et la structure glandulaire, confirmant au niveau moléculaire le caractère endométriosique de cette choriodécidue anormale. Les gènes les plus

dérégulés dans la CDosis, étaient liés au placenta, au processus métabolique des ARNm, rappelant la présence de trophoblastes mais également à l'expression des ribosomes déjà observées dans les lésions endométriosiques [273, 274].

L'analyse de la méthylation a montré des modifications en liens avec une hyperméthylation dans la CDosis par rapport aux témoins. Comme pour la signature transcriptomique, la signature épigénomique dans la CDosis implique des procédés compatibles avec une implantation ectopique de cellules endométriosiques tels que l'auto-immunité, la vasculogénèse, et la neurogénèse. La plupart des régions différenciellement méthylés (~ 75%) étaient intergéniques et en dehors des îlots CpG. Ceci peut expliquer pourquoi les signatures moléculaires du méthylome et du transcriptome ne partagent pas un nombre important de gènes. En outre, la plupart des modifications de la méthylation des sites CpG ne semble pas être, à première vue, liés aux variations de l'expression génique. D'autres analyses sont donc nécessaires pour déterminer les relations qui peuvent exister entre l'état de méthylation des CpG et la régulation de l'expression génique dans les lésions endométriosiques.

Pourtant l'analyse globale de la méthylation nous a fourni des informations nouvelles sur des processus suspectés dans la physiopathologie de l'endométriose tels que des phénomènes d'auto-immunité (identifié par la présence du marqueur CD20, marqueur de différenciation des lymphocytes B) de néoangiogénèse (identifiée par la présence du marqueur CD31, marqueur de différenciation de cellules endothéliales) et de neurogénèse (identifié par la présence du marqueur BDNF).

Les changements hormono-indépendants décrits ici dans la CDosis sont similaires aux travaux récents de Pietro Santulli qui met en évidence une incapacité des traitements hormonaux à contrôler la progression de l'endométriose ou à améliorer les processus

inflammatoires [99]. De surcroît, cette étude récente a mis en évidence que l'expression des récepteurs aux estrogènes était plus faible et que l'expression des récepteurs à la progestérone était plus élevée dans la décidue des femmes atteintes d'endométriose, qui par la suite étaient enceintes dans l'année [275]. Ces éléments soulignent la disparité qui peut exister dans l'altération de la fertilité et les issues de la grossesse chez les femmes atteintes d'endométriose. La question de l'impact de l'endométriose sur la grossesse n'est actuellement pas résolue. La maladie est associée à une augmentation des risques obstétricaux comprenant les fausses couches, l'accouchement prématuré, le retard de croissance intra-utérin, la pré-éclampsie, et les troubles de placentation [140, 144, 276-280]. Dans cette étude, toutes les patientes ont accouché à terme après une grossesse non compliquée.

Les analyses de ce modèle particulier de cellules endométriales en contact direct dans les tissus non-utérins, les membranes fœtales semi-allogéniques, nous ont permis de caractériser les lésions de type endométriosiques, spontanément générés à cette interface particulière. Pendant la grossesse normale, la choriodecidue est maintenue dans un état immunitaire tolérant avec des lymphocytes NK déciduaux ayant un rôle immunorégulateur [281]. Chez les femmes non enceintes, les lymphocytes NK déciduaux sont impliqués dans la clairance des cellules de l'endomètre pendant la menstruation et également régurgitées dans la cavité péritonéale par le reflux tubaire [282]. Ici, dans la choriodecidue malade, un environnement immunitaire modifié localement peut être favorable à la différenciation des lésions d'endométriose.

Endometriosis also affects the decidua in contact with the fetal membranes during pregnancy

L. Marcellin^{1,2,3,*}, P. Santulli^{1,2}, J. Gogusev^{1,3}, C. Lesaffre¹, S. Jacques¹, C. Chapron^{1,2}, F. Goffinet^{3,4}, D. Vaiman^{1,3}, and C. Méhats^{1,3}

¹Cochin Institute, Inserm U1016, CNRS 8104, Université Paris Descartes, Paris, France ²Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Médecine, Port Royal – Hôpitaux Universitaires Paris Centre, Service de Gynécologie-Obstétrique II et Médecine de la Reproduction, Paris, France ³Université Paris Descartes, DHU Risques et Grossesse, Paris, France ⁴Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, AP-HP, Groupe Hospitalier Universitaire Ouest, Centre Hospitalier Universitaire Cochin Broca Hôtel Dieu, Port Royal Maternity, Department of Gynecology Obstetrics I, Paris, France

*Correspondence address. Cochin Institute, Inserm U1016, CNRS 8104, Université Paris Descartes, Paris, France. Tel: +33-1-44-41-23-19; Fax: +33-1-44-41-23-02; E-mail: louismarcellin@gmail.com

Submitted on July 1, 2014; resubmitted on October 31, 2014; accepted on November 10, 2014

STUDY QUESTION: Are the fetal membranes of women affected with endometriosis similar to those from disease-free women?

SUMMARY ANSWER: Decidua of women with endometriosis is able to generate endometriotic-like lesions in contact with the fetal membranes.

WHAT IS KNOWN ALREADY: Eutopic endometrium of women affected with endometriosis presents compromised properties. Endometrium undergoes decidualisation to accept and to further control the conceptus development during pregnancy. Decidualized endometrium is in close contact with the chorionic membrane and forms the choriodecidual layer, a major maternal–fetal interface.

STUDY DESIGN, SIZE, DURATION: This is a laboratory case–control study involving diseased versus control samples. Eleven case samples and 11 control samples were collected from women in a tertiary care/research center between November 2011 and December 2013.

PARTICIPANTS/MATERIALS, SETTING, METHODS: Participants were consecutive pregnant women affected with confirmed endometriosis and disease free women, who underwent Cesarean section before labor for obstetrical indication. The choriodecidual tissues were characterized using histology, immunohistochemistry, transcriptomic and whole genome CpG methylation analyses.

MAIN RESULTS AND THE ROLE OF CHANCE: We demonstrate for the first time the presence of endometriotic-like lesions within the decidual side of the choriodecidual layer of the fetal membranes from women affected with severe endometriosis. Fetal membranes from women affected with endometriosis exhibited glandular components in the choriodecidual layer surrounded by enlarged decidualized cells disseminated along the entire membrane surface. Significant deregulation (variation of expression ≥ 2 , P -value ≤ 0.05) was observed for 2773 genes known to be enriched in processes involved in glandular function, endocrine and nervous system, neoangiogenesis, and autoimmune disease. CpG methylation analysis revealed 5999 differentially methylated regions with a P -value ≤ 0.05 .

LIMITATIONS, REASONS FOR CAUTION: We studied women who delivered at term by Cesarean section before labor, following an uneventful pregnancy. Notwithstanding this, one cannot exclude that the presence of disseminated endometriotic lesions within the choriodecidual layer of the fetal membranes may disturb the anatomical integrity and/or the function of the membranes in some women with endometriosis.

WIDER IMPLICATIONS OF THE FINDINGS: Our results shed new light on the capability of the diseased decidua to develop lesions not only at ectopic autologous locations, but also on the semi-allogeneous fetal membranes, a particularly immunotolerant environment.

STUDY FUNDING/COMPETING INTEREST(S): The authors have no competing interests to declare. The study was supported by a research grant of the AP-HP (CRC 10134).

Key words: endometriosis / decidua / pregnancy / fetal membranes

Introduction

Endometriosis is a common chronic hormone-dependent gynecologic disorder associated with persistent pelvic pain and/or infertility (de Ziegler *et al.*, 2010). The disease affects ~15% of women of child-bearing age and is characterized by the development of glandular and stromal endometrium-like tissues, in ectopic locations (Giudice, 2010), associated with an impaired differentiation of the endometrium (Brosens *et al.*, 2010). Several studies have demonstrated changes in the eutopic endometrium of women with endometriosis (Fowler *et al.*, 2007; Brosens *et al.*, 2010; Afshar *et al.*, 2013). In normal conditions, endometrium undergoes decidualisation during the secretory phase of the menstrual cycle that persists when implantation of the blastocyst occurs. This progesterone-controlled differentiation corresponds to the transformation of stromal fibroblasts into epithelioid-like decidual cells and to an associated massive influx of immune cells (Brosens *et al.*, 2009). During pregnancy, decidualisation serves primarily to control the implantation of the conceptus and to support a harmonious development of the embryo and its annexes (i.e. placenta and fetal membranes), while maintaining the integrity of the uterus during these processes. Compromised decidualisation of endometrial stromal fibroblasts has been described and is thought to participate as a causal factor for poor implantation rates in women affected with endometriosis (Aghajanova and Giudice, 2011; Harb *et al.*, 2013; Lessey *et al.*, 2013).

As pregnancy progresses, the chorionic layer of fetal membranes develops a large interface of maternal–fetal interaction where trophoblasts and decidual tissue intermingle. We reasoned that this contact represents the unique physiological interaction between the decidual tissue with a non-uterine soft tissue. An open question in endometriosis is the inherent capacity of endometrial tissue to form lesions in contact with non-uterine soft tissue. Furthermore, endometriosis is described as an estrogen-dependent disorder, linked to resistance to progesterone action in the endometrium (Burney *et al.*, 2007; Brosens *et al.*, 2012). Then, the behavior of diseased endometrium in a steroid-saturated environment, such as in pregnancy, deserves particular consideration. We designed a study to investigate the presence of endometriosis-like lesions in the fetal membranes in pregnancy from women with endometriosis in order to challenge these yet open questions. From this point of view, choriodecidua may be considered as an original *in vivo* model to investigate the behavior of diseased-endometrial cells within contact to non-uterine tissue under a hormonally saturated state.

Herein, we explored the changes of the choriodecidua in women with endometriosis (CDosis) through histology, immunohistochemistry (IHC), high throughput genomic and epigenomic analyses, in order to gain insight into the intrinsic molecular mechanisms involved in endometriosis.

Materials and Methods

Human choriodecidua samples

All participants signed informed consent at the Department of Obstetrics, Port Royal Maternity, Cochin University Hospital, Paris, France. The study protocol and the use of human tissue were approved by our Institutional Ethical Committee (Comité de Protection des Personnes Ile de France III, Am-5724-I-COL2991, 05/02/13). Placentas with their attached membranes were collected from women affected with severe endometriosis and from control subjects. Cases and controls were delivered by Cesarean

section at term before labor for obstetrical indication following an uneventful pregnancy between 2011 and 2013 at the Port Royal Maternity. Cases, all affected with painful deep infiltrating endometriosis (DIE) (Chapron *et al.*, 2003) were either operated before pregnancy for complete surgical resection of the endometriotic lesions (histologically confirmed for the presence of glands and stroma), or had a complete imaging workup before pregnancy that confirmed the diagnosis of endometriosis (Abrao *et al.*, 2007; Guerriero *et al.*, 2008; Piketty *et al.*, 2009). Controls samples were collected from women without past history of either endometriosis or chronic pelvic pain. After delivery, collected fetal membranes were separated from the placenta in the operating room and rinsed in phosphate-buffered saline (PBS) to remove blood clots. Within 15 min of collection, biological samples were further processed in the laboratory. Choriodecidua was peeled from the amnion and appropriately prepared for RNA and DNA extractions, and IHC. This procedure yields pure specimens of choriodecidua as previously shown (Breuille-Fouche *et al.*, 2010). To reduce the high cost of individual transcriptome of single pool and limit the influences of individual differences among patients, three distinct pools of three series of case and control RNAs and DNAs were analyzed. The whole cohort of 111 cases and controls was used for the quantitative RT–PCR and IHC analyses.

RNA isolation

Total RNA was isolated from the choriodecidua of the fetal membranes from cases and controls, firstly lysed in Trizol (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), using the total RNA isolation Qiagen RNeasy kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's protocols. Total RNA samples were eluted in RNase-free water. Purity and concentration were evaluated using a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Total RNA sample concentrations were quantified using spectrophotometry by measuring absorbance at 260 nm and each sample was checked for integrity in a RNA nano-chip into Bioanalyzer System at the genomic platform of the Cochin Institute (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). All samples had an RNA integrity number above 6.5. Isolated RNA was stored at -80°C until processing.

Microarray analysis

Gene expression was assessed by hybridizing the cRNA samples to NimbleGen 12×135 K Microarrays (Roche NimbleGen, Roche Diagnostics, Meylan, France) at the genomic platform of the Cochin Institute.

Microarray data processing

Microarray raw data were processed using the ANAIS software (Simon and Biot, 2010). Array quality was assessed at the probe level. Robust Multi-Array analysis, background normalization, and quantile intra- and inter-array normalization were performed. Genes with signal intensities above a random threshold of 95% were chosen for further studies. Finally, the probes were tested for differential gene expression with a nominal P -value ≤ 0.05 considered to be significant. Among those, genes showing a variation of 2-fold were further considered in the study. The microarray data have been submitted to Gene Expression Omnibus (accession number: GSE57733).

The transcriptomic data obtained from the study of choriodecidua layer were then compared with the data from the microarray analysis of Borghese and coworkers on expression profile of endometrioma (OMA) versus eutopic endometrium (Borghese *et al.*, 2008). Gene ontology (GO) enrichment analyses were then performed for the differentially expressed genes using GePS Genomatix software (Release 2.4.0 Genomatix Software GmbH, Munich, Germany) (Subramanian *et al.*, 2005). A P -value < 0.05 was considered significant.

Real-time PCR

The extracted RNAs were treated with deoxyribonuclease (DNAse, Invitrogen Life Technologies, St Aubin, France) to remove any contaminating DNA. Total RNAs were reverse transcribed using random primers and moloney murine leukemia virus Reverse Transcriptase (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. A negative control without RNA was included in each series of reverse transcription reactions. Each sample was resuspended in presence of RNaseOut (Invitrogen). Quantitative RT-PCRs were performed as previously described (Santulli et al., 2012). A set of 12 genes, including 10 target genes and 2 reference genes (internal controls), was analyzed by quantitative RT-PCR using cDNA synthesized from each sample. Primers for RT-PCR analysis were chosen using the PRIMER3 software, based on published sequences (Supplementary Table S1). The relative abundance fold changes of each target gene compared with a geometric mean of two different reference genes (ubiquitin C and Cyclophilin B, $Ct = 24.0$) were determined by the formula $-2\Delta\Delta Ct$ (Livak and Schmittgen, 2001). Results were analyzed with the LightCycler software using 2nd derivation method.

Illumina 450 K methylation

DNA was extracted from the chorionic decidua using the DNEasy kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. Genomic DNA was bisulfite converted using the EZ DNA Methylation kit (Proteogene, St Marcel, France), according to the manufacturer's protocol and purified with columns. A whole genome amplification step was followed by enzymatic end-point fragmentation and hybridization to Infinium HumanMethylation 450 BeadChip (Illumina, San Diego, CA, USA). This array includes 485 577 cytosine positions of the human genome (482 421 CpG sites (99.4%), 3091 non-CpG sites and 65 random single nucleotide polymorphisms). After the extension step and staining, the BeadChip was washed and scanned using the Illumina HiScan SQ scanner. The intensities of the images were extracted using the GenomeStudio software (v.2011.1).

Methylome data processing

Methylome array data were processed using the RnBeads R package which allows comprehensive analysis of DNA methylation data obtained with any experimental protocol that provides single-CpG resolution (Assenov et al., 2014). Probes mapping to the X and Y chromosomes or to non-CpGs dinucleotides were excluded. After quality check, the microarray probes were filtered and their median foreground intensity was normalized with the 'Swan' method (Maksimovic et al., 2012). The probe intensities were then converted to beta values. The probes were tested for differential methylation using the 'limma' method, a linear model followed by empirical Bayesian statistics for the comparisons of interest (Ritchie et al., 2006). Among the 485 577 probes present on the microarray, 465 992 were retained for further analyses after pre- and post-filtering. The interaction between CpG status (hypo- versus hyper-methylated) and CpG location with respect to the intragenic, promoter or body, or intergenic location was tested. A GO enrichment analysis was then performed for the differentially methylated regions (DMRs) with an intragenic location using the GePS Genomatix software.

Immunohistochemistry

Briefly, 4- μ m thick tissue sections were cut sequentially and mounted on Super-frost pre-treated slides (Menzel-Glaser, Braunschweig, Germany). After deparaffination in xylene, rehydration through graded ethanol concentrations, and antigen retrieval in citrate buffer at pH 6.0, the sections were incubated for 12 h at 4°C with primary antibodies (diluted 1:100 in PBS-1% bovine serum albumin -0.1% Triton) including mouse monoclonal anti-Cytokeratin 7 (clone OV-TL 12/30, Dako, Glostrup,

DK), mouse monoclonal anti-Vimentin (clone V-9, Dako), rabbit polyclonal anti-estrogen receptor (ER) (18-0174, Invitrogen, St Aubin, France), and mouse monoclonal anti-progesterone receptor (PR) (clone PgR 636, Dako) antibodies to characterize: (i) the membrane layers; amnion and decidua being Vimentin +; chorion, cytotokeratin +, (ii) the epithelial or the stromal components, Cytokeratin + and Vimentin + respectively, and (iii) sex steroid hormone responsive cells, ER+/- and/or PR+/-, to define endometriotic-like glandular structures. To validate the genomic findings, tissue sections were incubated with primary antibodies for 12 h including rabbit polyclonal anti-cMyc (GE10, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), rabbit polyclonal anti-cJun (68A2, Cell signaling technologies, Danvers, MA, USA), mouse monoclonal anti-C20 (L26, Bioprime, Kronshagen, Germany), mouse monoclonal anti-CD31 (clone JC/70A, Dako) and rabbit polyclonal anti-BDNF (SC-546, Santa Cruz Biotechnology) antibodies. The reactions were revealed using the Novolink polymer detection system (Leica, Nanterre, France) according to the manufacturer's recommendations.

Results

Subject characteristics

The general characteristics of the subjects are reported in Supplementary Table SII. Women affected with DIE and women of the control group were comparable with respect to age, and gravidity. Parity was significantly lower in the case group, as well as neonatal birthweight of the offspring. Obstetrical indications for Cesarean section did not differ between the two groups. Seven (63.6%) of the cases were surgically treated before pregnancy while four (36.4%) of the cases had a complete imaging work up that confirmed the existence of DIE. Pregnancies of three (27.3%) cases and one (9.1%) control were obtained by assisted reproductive technologies.

Comparative gross examination

Thickening of the chorionic decidua and presence of nodular lesions was observed in all of the eleven cases, in comparison to controls (Fig. 1A and B). The nodules were multiple, of different sizes, red and/or brownish in color, and randomly distributed across the fetal membrane circumference. These lesions were implanted on the decidual layer and were surrounded by small vessels. The majority of the nodular lesions showed a network of distended atrophic cystic glands, whose wall was lined by cuboidal epithelial cells, some of them developing hyperplastic papillary projections (Fig. 1C and D). In some areas, smaller size glands were also found, surrounded by myxoid stroma admixed with scattered inflammatory cellular infiltrates and fibrinoid deposits. Decidual cells surrounding the lesions were round and enlarged, with large vacuoles, when compared with control tissue (Fig. 1C and E). In addition to the atrophic cystic glands, scant isolated areas containing microscopic chorionic pseudo cysts (MCPs) filled with a homogeneous eosinophilic material were observed (Fig. 1D). These MCPs were, however, also observed in the control membranes (Fig. 1F).

Comparative immunolabelling analysis

To further characterize the presence of nodular lesions and the adjacent surrounding tissue within the fetal membranes, we focused on immunohistological markers: cytotokeratin 7, vimentin, and steroid hormones receptors ER and PR. In cases and controls, trophoblasts were cytotokeratin 7 positive, while the amnion and decidua were vimentin positive

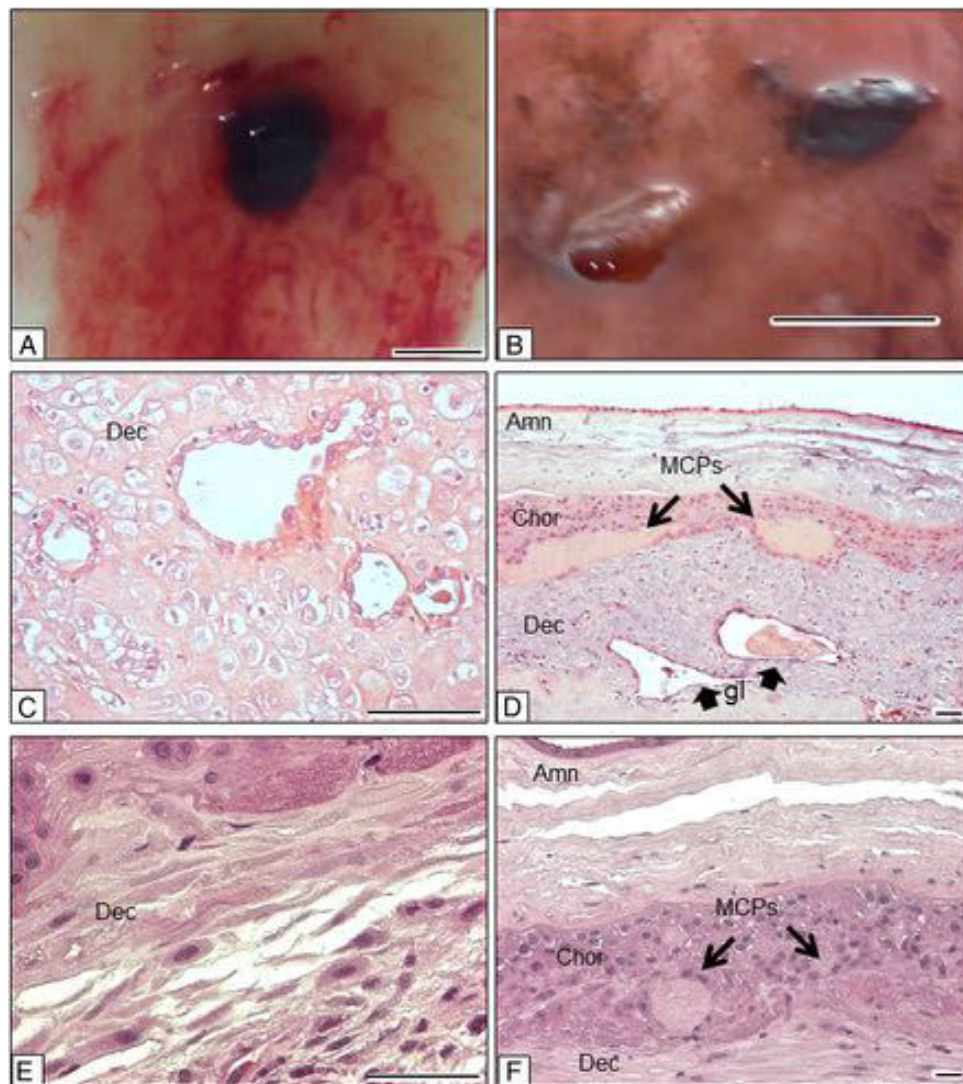


Figure 1 Macroscopic aspect and histology of fetal membranes from women with endometriosis. Macroscopic view of red brownish nodules in fetal membranes from two endometriosis cases (**A** and **B**), scale bars, 10 mm. Presence of atrophic cystic glands surrounded by decidualized cells and smaller size glands (**C**). Selected area containing microscopic chorionic pseudocysts (MCPs) in the vicinity of two atrophic glands (gl) surrounded by decidualized cells in a case (**D**). Close-up of decidual cells in a case (**E**). MCPs are also present in choriodecidua of disease-free women (**F**). Scale bars, 100 μ m. Amn: amnion Chor: chorion, Dec: decidua.

(Fig. 2A–D). Specifically in CDosis, the pseudo-glandular wall lining cells exhibited intense immunoreactivity for cytokeratin 7, while the enlarged decidualized cells surrounding the glands presented a stronger vimentin staining in comparison to controls. Only in CDosis, the nucleus of decidual cells was positive for ER (Fig. 2E and F). The nucleus of the decidualized cells surrounding the glands was also strongly immunoreactive for PR antigens in CDosis, while fewer decidual cells were PR positive in controls and displayed a less intense staining (Fig. 2G and H).

Comparative transcriptome analysis

To gain insight in molecular processes in CDosis, we performed a comparative transcriptional analysis of the choriodecidua from cases and controls. Principal component analysis indicated that >95% of the observed variability can be summarized in two major components: the F1 axis,

which describes the common origin of the samples, i.e. choriodecidua, and the F2 axis which distinguishes cases from controls (Fig. 3A). As represented on a heatmap and a volcano plot (Fig. 3B and C), 2773 genes have a significant variation of expression ≥ 2 (1235 down-regulated and 1538 up-regulated genes, respectively). The list of the 2773 deregulated genes in CDosis is presented in [Supplementary Table SIII](#). The expression level of ten genes was further investigated by RT–qPCR (Fig. 3D and [Supplementary Table SIV](#)). In CDosis, the expression level of activating transcription factor 3 (ATF3), estrogen receptor 1 (ESR1), lymphoid enhancer-binding factor 1 (LEF1), neuronal cell adhesion molecule (NRCAM) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) were significantly increased when compared with controls (6.7-, 16.9-, 26.5-, 3.5- and 5.3-fold, respectively; $P < 0.05$). In contrast, in CDosis, expression of small proline-rich protein 3 (SPRR3), interleukin

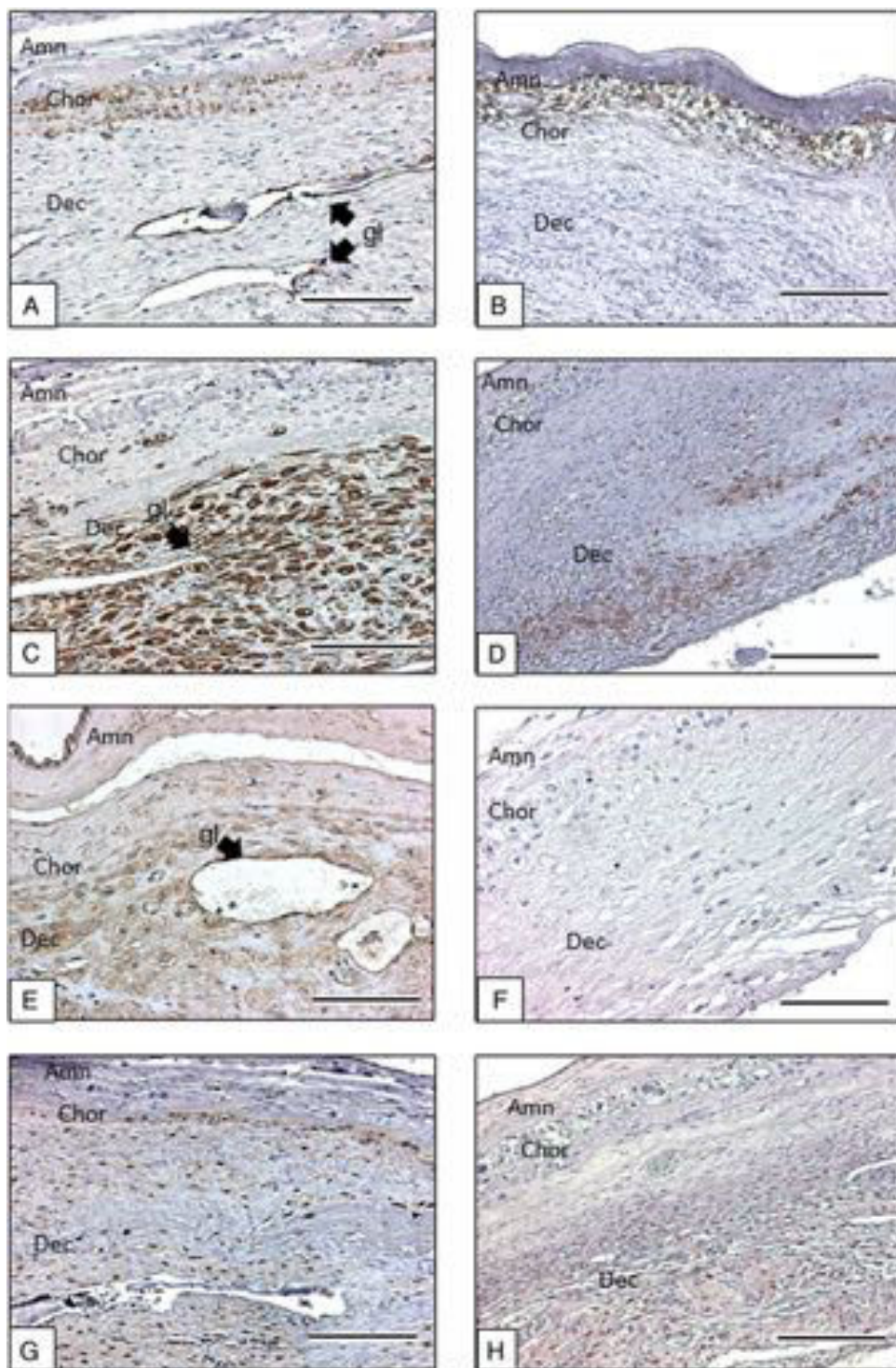


Figure 2 IHC analysis of cytotokeratin, vimentin, and steroid receptors, ER and PR, in choriodecidua of women with endometriosis versus controls. High-magnification of fetal membrane sections collected from women with endometriosis (left panel) and from controls (right panel). Immunohistochemistry analyses encompass cytotokeratin 7 (**A** and **B**), vimentin (**C** and **D**), ER (**E** and **F**) and PR (**G** and **H**) staining, respectively. The immunohistochemistry reaction was revealed with DAB as a substrate, brown depots being the signal. Scale bar, 100 μ m.

7 receptor (IL7R), high mobility group AT-hook 1 (HMGA1), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), and BARX homeobox 2 (BARX2) were significantly decreased when compared with controls

(4.6-, 15.4-, 44.4-, 11.0- and 9.4-fold, respectively; $P < 0.05$). Among the 2773 deregulated genes, GO analyses revealed significant enrichment of GO terms related to glands, endocrine system, neurons,

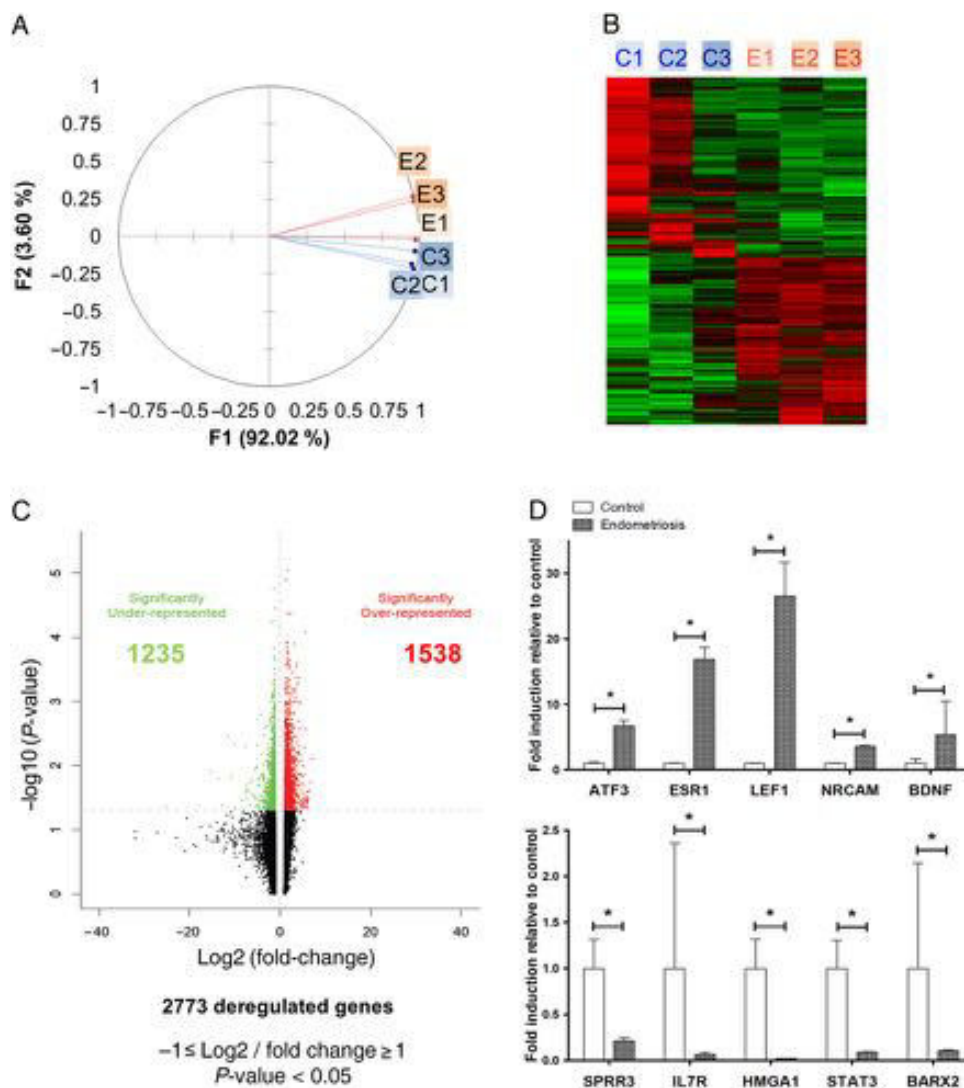


Figure 3 Transcriptome signature of choriodecidua from women with endometriosis. **(A)** Principal component analysis of gene expression in choriodecidua of women with endometriosis (CDosis) (E) and controls (C). Each vector represents a biological replicate pool. **(B)** Hierarchical clustering of the probes whose expression had a variation ≥ 2 across CDosis (E) versus controls (C) pools; green, down-regulated genes; red, up-regulated genes. **(C)** Volcano plot representation of all the probes in the microarray with the log (base 10) of the probability values (y-axis) plotted against the log (base 2) fold changes (x-axis). Colored (green and red) dots referred to genes that have a variation ≥ 2 with a P -value ≤ 0.05 . **(D)** Real-time PCR evaluation of mRNA expression of five up-regulated and five down-regulated genes (ATF3: activating transcription factor 3, ESR1: estrogen receptor 1, LEF1: lymphoid enhancer-binding factor 1, NRCAM: neuronal cell adhesion molecule, BDNF: brain-derived neurotrophic factor, SPRR3: small proline-rich protein 3, IL7R: interleukin 7 receptor, HMGA1: high mobility group AT-hook 1, STAT3: signal transducer and activator of transcription 3, BARX2: BARX homeobox 2) in CDosis versus controls. * $P \leq 0.05$ (non-parametric Wilcoxon test).

autoimmunity, translation and metabolism in general, all known to be important in the development and progression of endometriosis (Table I).

We next performed a comparison between the genes deregulated in CDosis and those reported as deregulated in endometrioma (OMA) occurring in non-pregnant women (Borghese *et al.*, 2008). Seven hundred and seventy-six genes were common (χ^2 , 21.739; P -value, 3.12×10^{-6}), with enrichment in GO terms related to immunity, nervous system, endometrium, glandular structure and estrogen activity as top processes (Fig. 4). In CDosis, 1997 genes were unique, related to blood, leucocyte, placenta, endocrine system, sensory organ and mRNA metabolic process, while OMA samples were enriched in

genes related to fibrosis, vascular system and inflammation in the top processes.

Comparative methylome analysis

We next used Illumina's HumanMethylation450 beadchips to compare global profile of methylation in CDosis to controls. On the 450 K DNA Illumina Methylation array, 485 577 cytosine positions of the human genome were evaluated. From these cytosine sites, 19 595 (4.03%) positions were excluded because they were located either on the X and Y chromosomes or were non-CpGs dinucleotides. Density

Table I Gene ontology (GO) enrichment in transcriptome of CDosis versus controls according to GePS.

GO term	Observed genes	Expected genes	P-value*
Glands	1939/2773	1640/12 087	2.80×10^{-41}
Endocrine system	1547/2773	1270/9349	1.29×10^{-32}
Placenta	1900/2773	1630/12 608	2.37×10^{-32}
Nervous system	2142/2773	1920/14 183	3.54×10^{-28}
mRNA metabolic process	163/2773	84/598	5.04×10^{-18}
Motor neuron disease	221/2773	169/1331	9.46×10^{-6}
DNA-repair deficiency disorders	216/2773	167/1312	2.11×10^{-5}
Autoimmune disease	49/2773	30/226	2.79×10^{-4}
IL-12 mediated signaling events	19/2773	9/63	1.13×10^{-3}

CDosis, choriodecidia of endometriosis-affected women; GePS, Genomatrix Pathway System; IL, interleukin.

*Chi-squared test.

estimations derived from the full-range of normalized beta values from each pool, shown in Figure 5A, showed an overall unidirectional shift in methylation toward hypermethylation in CDosis. To note, there is not a strict bimodal frequency distribution of methylation, but rather a sharp peak at the beta value of 0 and a large shallow peak between the values of 0.5 and 1. This most probably reflects differences in methylation within the different cells that compose the choriodecidia rather than substantial hemi-methylation. In fact, from the 465 992 CpGs dinucleotides studied, 21 468 were differentially methylated, defining 5999 DMRs that were considered as significantly deregulated (P -value < 0.05) with 257 (4.3%) hypo-methylated and 5742 (95.7%) hypermethylated regions (Fig. 5B, Median (interquartile range): 0.063 (0.04, 0.09)). Given the tissue heterogeneity, we did not apply a cutoff for the delta of beta values. Modified DMRs were distributed among all the 22 autosomal chromosomes, with no concentration of DNA methylation changes at specific chromosomal hot spots (Fig. 5C). We then studied the genomic functional distribution of the 5999 significantly differentially methylated positions. Systematically we observed that whatever the genome position, hypermethylation was strikingly more represented than hypomethylation (Fig. 5D). The majority of differentially methylated loci (94.4%) were located outside of the CpG Islands. The intragenic locations corresponded to 1209 genes, in total. Non-supervised analysis of these genes revealed an enrichment in GO terms related to neurons, neoplasms, receptor activity and immunity (MHC Class II, Brunton's disease) (Table II).

We next examined whether hyper- or hypomethylation status was correlated positively or negatively to gene expression in CDosis and found no significant correlation (Fig. 5E). Comparison of the list of genes that are deregulated in the transcriptomic array with the genes which contained differentially methylated CpG did not show any significant enrichment in common genes (χ^2 , 0.146; P , 0.70).

Immunohistochemical validation of transcriptome and methylome data

In accordance with our transcriptomic data, c-Myc and c-Jun were over-expressed >4 -fold. We evaluated their expression by IHC and found high immunostaining for c-Myc in the cytoplasm of decidual cells (Fig. 6A and B) as well as nuclear presence of c-Jun (Fig. 6C and D) in cases when compared with control samples.

To validate at the protein level the GO terms enrichment with regards to autoimmunity, vascularization and neurons, we performed IHC experiments. We observed *de novo* expression of CD20 antigens, specific for lymphocytes B (Fig. 7A), CD31, specific microvascular structures (Fig. 7C) and BDNF epitopes, related to neurogenesis (Fig. 7E) in the decidual part of the CDosis. None of these three immunoreactivities were observed in control samples (Fig. 7B, D and F).

Discussion

In this study, we report for the first time the presence of endometriotic-like lesions on the decidual layer in contact with the fetal membranes of women affected with severe endometriosis. We describe specific alterations of choriodecidia at the histological, transcriptomic and epigenomic levels.

Histological and immunohistological aspects of CDosis resemble peritoneal endometriosis

We observed red brownish nodular lesions located in the decidual layer of CDosis, a macroscopic aspect similar to that generally seen in peritoneal endometriosis (Vercellini et al., 2014). All these structures appeared as implanted into the decidual layer. Both histological and immunohistochemical features of decidia from women with endometriosis strongly resemble the histological and IHC observations in endometriosis, including epithelial papillary projections, fibrinoid deposits and strong immunoreactivity of cells lining the cysts for cytokeratin, and in stroma for vimentin, c-Myc, c-Jun, ER and PR (Norwitz et al., 1991). Comparatively, the endometriotic-like gland histomorphology is wholly different from that of the MCPs detected in the membrane trophoblast layer. The MCPs are a common finding in normal conditions and were previously described as hypoxia-associated placental lesions (Stanek, 2013).

Differential gene expression and methylation pattern in CDosis

The transcriptomic analysis allowed us to characterize a differential pattern of gene expression in CDosis. A significant number of these deregulated genes are also deregulated in endometrioma. This subset of genes was related to immunity, nervous system, endometrium and

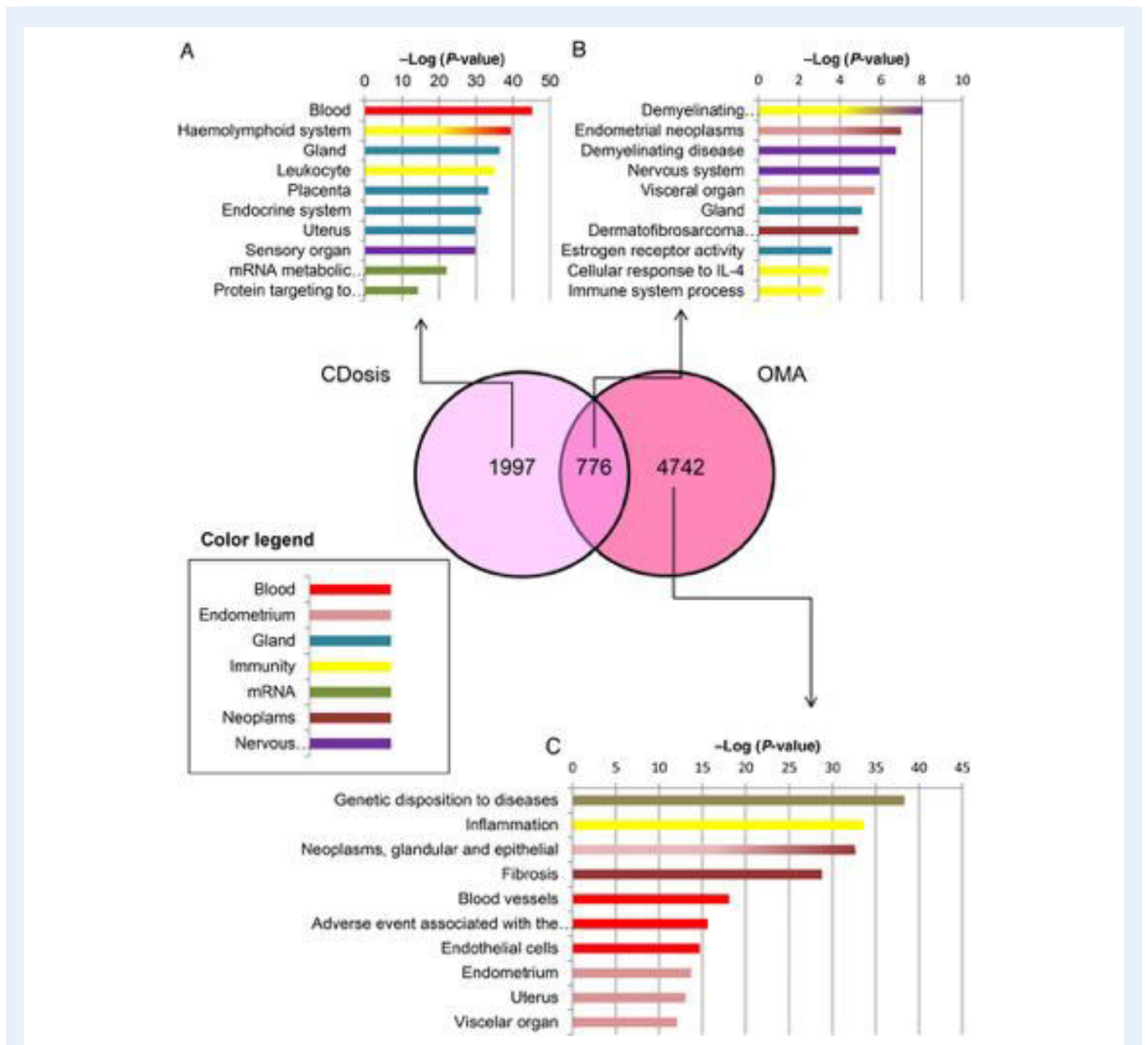


Figure 4 Comparison of the transcriptome signature of choriodecidua from women with endometriosis with the transcriptome signature of endometrioma. Venn diagram representations of the significant over-represented gene ontology (GO) terms in CDosis and from endometrioma (OMA). Unsupervised global analyses were performed on the common and uniquely represented clusters of the different subsets of genes using the GePS software from Genomatix. **(A)** Top ten enriched GO terms in deregulated genes, uniquely in CDosis; **(B)** Top ten enriched GO terms in deregulated genes, common between CDosis and OMA; **(C)** Top ten of enriched GO terms in deregulated genes, uniquely in OMA.

glandular structure, confirming the endometriotic-like character of this diseased tissue at the molecular level. The genes, only significantly deregulated in CDosis, were related to placenta, recalling for the presence of trophoblast and pregnancy, and to mRNA metabolic process. In this regard, increased ribosomes have already been observed in endometriotic lesions by transmission electron microscopy, as well as overexpression of genes coding for ribosomal proteins (Arimoto *et al.*, 2003; Jin and Zhou, 2010).

The methylation analysis showed that modifications were strongly biased toward global hypermethylation in CDosis versus controls.

Likewise in the transcriptomic signature, epigenomic signature in CDosis is consistent with processes known to be causing ectopic implantation of endometriotic cells: autoimmunity, vasculogenesis and neurogenesis. Most of the DMRs (~75%) were intergenic and outside the CpG islands, which may explain why the molecular signatures of the methylome and the transcriptome did not share a significant number of genes. Moreover, most CpG sites with variable methylation seem unrelated to the variation in gene expression. DNA methylation near the transcription site of a gene has been proposed to be associated with reduced expression (Jones and Liang, 2009). However, a wide

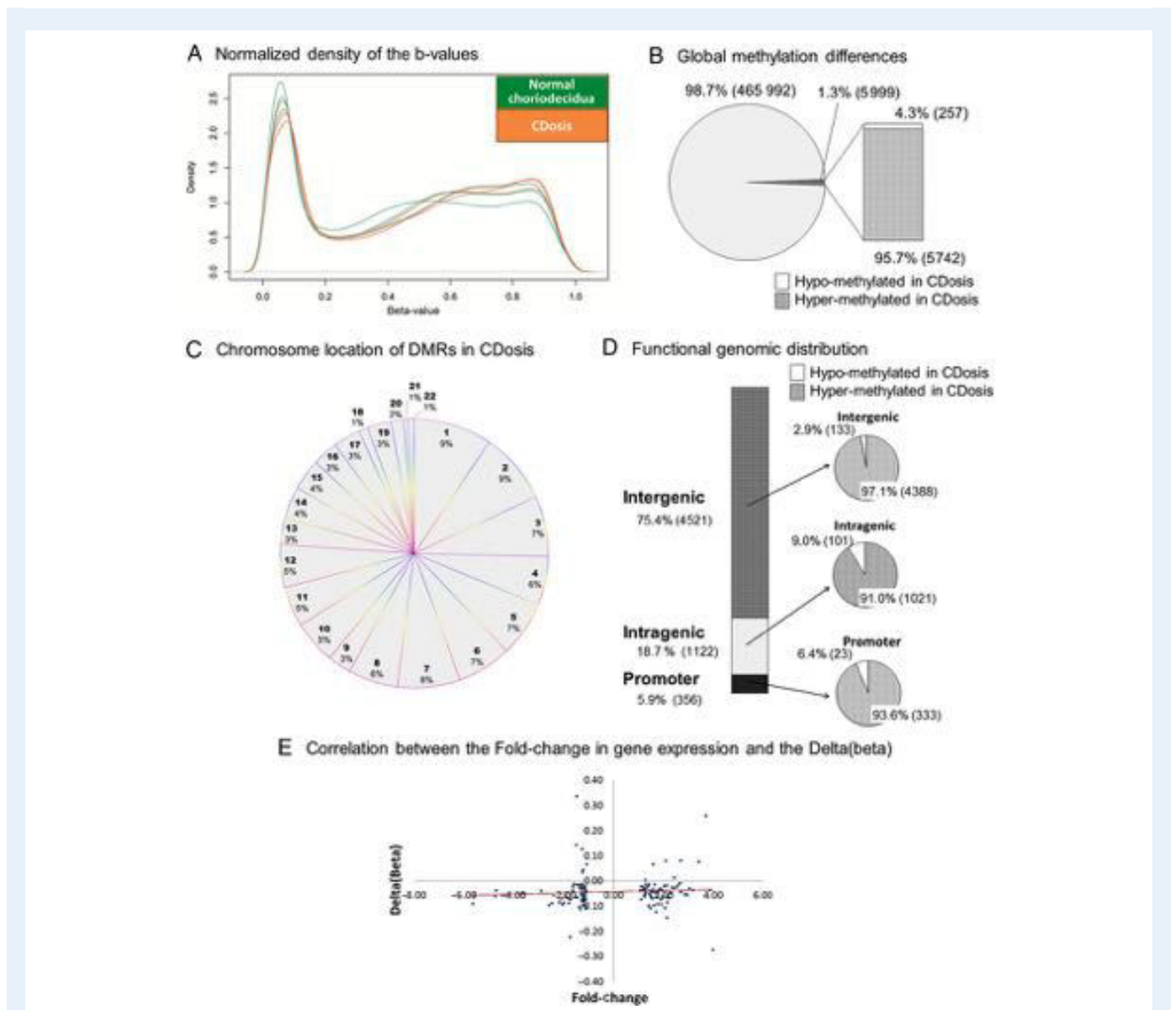


Figure 5 Global CpG methylation pattern in choriodecidua from women with endometriosis versus controls. **(A)** Global normalized density estimation in CDosis versus normal choriodecidua. **(B)** Pie chart showing the number of CpG sites hypo- or hypermethylated in CDosis compared with normal choriodecidua and the number of differentially methylated regions (DMRs). **(C)** Pie chart showing the distribution of DMRs in CDosis on the autosomal chromosomes. **(D)** Pie chart showing the distribution of the DMRs in CDosis based on their genomic context, intergenic, intragenic, and promoters. **(E)** Scatter plot of the fold change obtained from the transcriptome array and the delta of beta values obtained from the methylome array for the genes associated with significant deregulated expression and significant differential methylation in CDosis.

variety of relationships between gene expression and DNA methylation are now described and variation in expression is best predicted using specific chromatin marks rather than position of the CpG site with respect to the gene (Wagner et al., 2014). Further analyses are thus needed to investigate the relationships between hypermethylated CpGs and regulation of gene expression in endometriotic-like lesions. Yet global methylation analyses provide biological information about the functional state of tissues and cells and point to novel genes and pathways underlying diseases. To this point of view, autoimmunity phenomena are in close relationship with the pathogenesis of endometriosis (Eisenberg et al., 2012). Autoimmune organ-specific antibodies directed against

endometrial or ovarian proteins are present in peritoneal and peripheral fluids of women with endometriosis. Here we detected in CDosis unusual presence of cells positive for CD20, a marker of lymphocyte of B-lineage. The immunologic autoreactivity may derive from an inappropriate inflammation, activation of immune cells and production of cytokines. However, the role of autoantibody in endometriosis remains not well understood. Furthermore endometriotic lesions are typically characterized by a dense vascularization (Laschke et al., 2011). Neovascularogenesis is needed to provide oxygen and essential nutrient to guarantee survival and proliferation of lesions. In this regard, blood was the GO term enriched with the lowest P value in our

Table II GO enrichment in methylome of CDosis versus Controls according to GePS.

GO term	Observed genes	Expected genes	P-value*
Diseases susceptibility	417/1209	347/8347	6.29×10^{-8}
Neuroectodermal tumors	340/1209	278/6699	1.20×10^{-6}
Neoplasms, glandular and epithelial	478/1209	419/10075	2.58×10^{-6}
Neoplasm, nerve tissues	342/1209	284/6826	4.25×10^{-6}
Receptor activity	104/1209	70/1525	2.44×10^{-5}
Neuroendocrine tumors	222/1209	176/4248	4.28×10^{-5}
Hypertrophy	154/1209	113/2726	2.64×10^{-5}
MHC Class II protein complex	5/1209	0.7/16	5.84×10^{-4}
Axon initial segment	4/1209	0.5/10	7.51×10^{-4}
Bruton tyrosine kinase	10/1209	3.10/67	9.64×10^{-4}

*Chi-squared test.

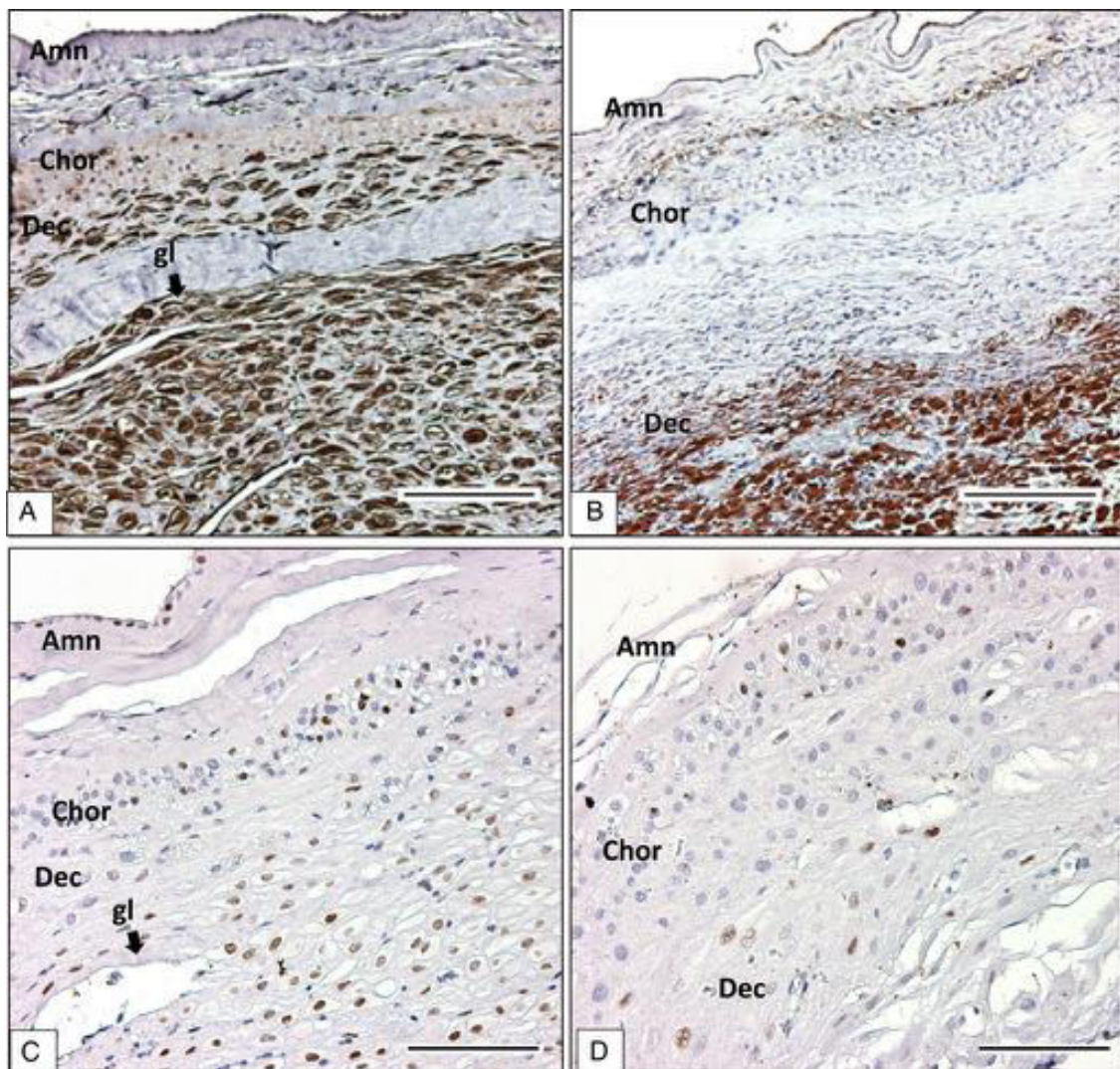


Figure 6 IHC analysis of c-Myc and c-Jun in choriodecidua of women with endometriosis versus controls. High-magnification of fetal membranes sections collected from women with endometriosis (left panel) and from controls (right panel). Immunohistochemistry analyses encompass c-Myc (A and B) and c-Jun (C and D) staining. The immunohistochemistry reaction was revealed with DAB as a substrate, brown depots being the signal. Scale bar, 100 μ m.

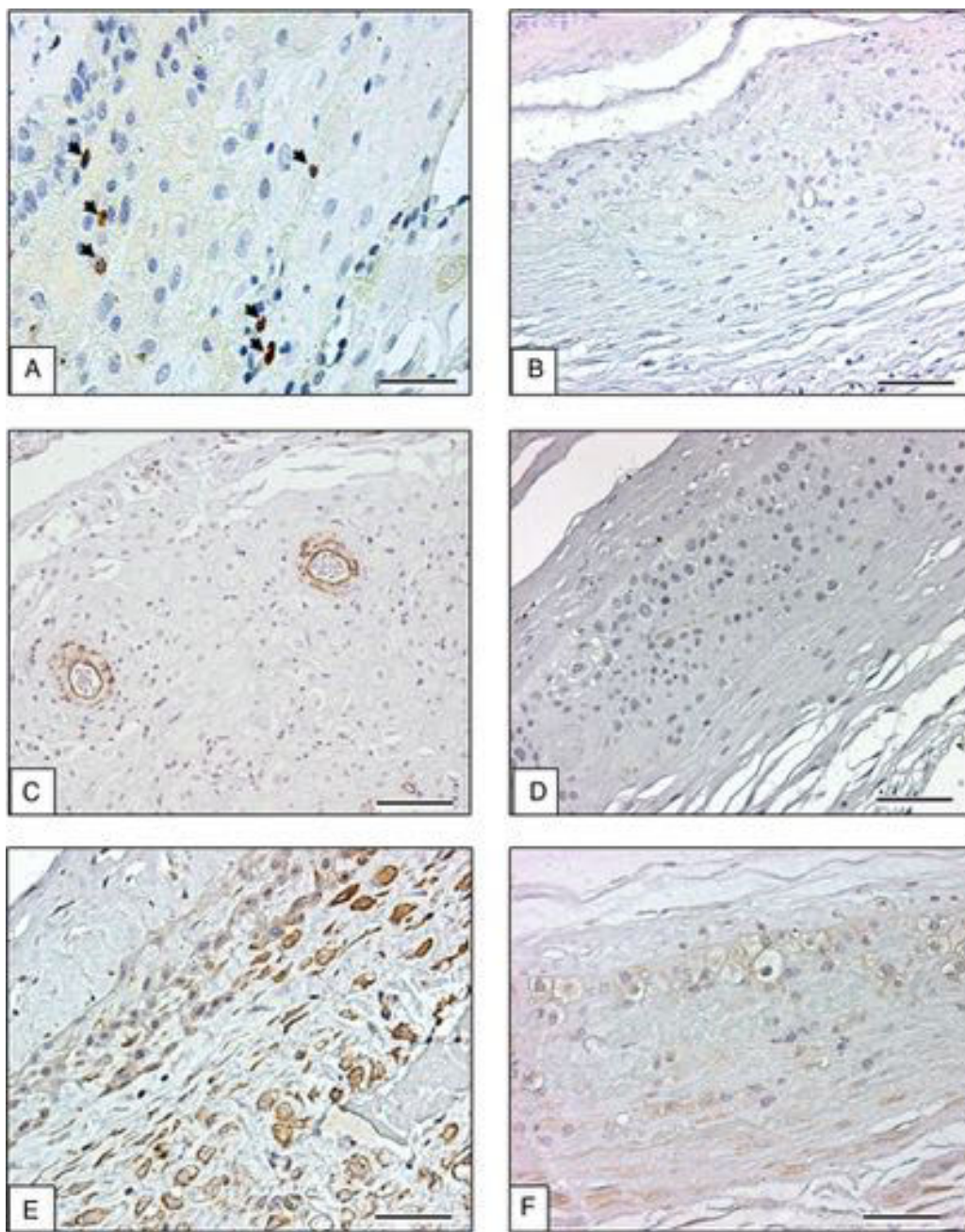


Figure 7 IHC analysis of CD20, CD31 and BDNF in choriodecidua of women with endometriosis versus controls. High magnification of fetal membranes sections collected from women with endometriosis (left panel) and from controls (right panel). Immunohistochemistry analyses encompass CD20 (**A** and **B**), CD31 (**C** and **D**) and BDNF (**E** and **F**) staining. Arrow heads indicate CD20 stained cells. The immunohistochemistry reaction was revealed with DAB as a substrate, brown depots being the signal. Scale bar, 100 μ m.

transcriptome analysis. Our findings indicate an increased microvessel density in CDosis, as identified with the endothelial marker CD31. Finally, neurotrophins have been previously documented in endometriosis highlighting the central role of these proteins in the genesis and modulation of pain in endometriosis (Borghese et al., 2010; Browne et al., 2012). Classically known for their participation in the development of nervous system, overexpression of neurotrophins has also been observed outside the nervous system (Yang et al., 2013). For instance,

BDNF, although abundant in the nervous system, is expressed in other cell types and tissues, and BDNF mRNA is found in the majority of the human organs (Pruunsild et al., 2007). BDNF is capable of activating the adhesion, angiogenesis, apoptosis and proliferation prominently involved in reproductive physiology. In a recent cross-species study, BDNF has been found conserved and ubiquitously expressed in mammalian uterus (Vessels et al., 2014). BDNF proteins were described to be more concentrated in biopsies from eutopic endometrium of women

with endometriosis compared with controls (Browne *et al.*, 2012). Herein, RNA expression of BDNF was increased from 6- to 8-fold in CDosis, and IHC documented the increased localization of BDNF within the decidual compartment.

Development of endometriotic-like lesions despite the high levels of steroid hormones during pregnancy

Endometriosis is described as an estrogen-dependent disorder in relation with progesterone-resistance, linked to the deregulation of a subset of progesterone-dependent genes. This is usually associated with increased expression of ER and decreased expression of PR and/or PR coactivators (Aghajanova *et al.*, 2010). Here, we found low level of expression of ER and high expression of PR in decidual cells of endometriosis-affected women. Moreover, all these processes occurred under the saturated hormonal state in pregnancy. The hormonal-independent changes described here in the diseased choriodecidual are similar to the recent finding of Santulli and coworkers, which highlights that hormonal treatments fail to control endometriosis progression and enhance inflammatory processes (Santulli *et al.*, 2014). Furthermore a recent study described lower expression of ER and higher expression of PR in decidua of women with endometriosis who subsequently became pregnant within 1 year (Moberg *et al.*, 2014). This piece of evidence points toward disparities in fertility impairment and pregnancy outcomes in women with endometriosis. It indeed remains unclear to what extent endometriosis affects pregnancy. The disease has been associated with higher risks of adverse obstetrical outcomes including miscarriage, premature birth, fetal growth retardation, pre-eclampsia and placentation disorder (Kortelahi *et al.*, 2003; Fernando *et al.*, 2009; Stephansson *et al.*, 2009; Benaglia *et al.*, 2012; Vercellini *et al.*, 2012; Harb *et al.*, 2013; Conti *et al.*, 2014). In the present study, all the eleven case patients gave birth at term after an uneventful pregnancy. However, neonatal weight at birth was significantly lower in women affected with endometriosis when compared with the control group, suggesting a less effective placental perfusion. A larger study, which will prospectively recruit women affected with endometriosis in earlier stages of pregnancy, is warranted on this topic.

Analyses of this particular model of endometrial cells in direct contact within non-uterine tissues, the semi allogenic fetal membranes, allowed us to characterize endometriotic-like lesions, spontaneously generated on this tissue interface. The lesions in the fetal membranes from women with endometriosis are located in the decidual layer and were never observed on the fetal side of the membranes, the chorion or the amnion. This is consistent with our hypothesis and reveals the unique capacity of diseased endometrium to spontaneously form nodular endometriotic-like lesions in direct contact with non-uterine soft tissue. During normal pregnancy, the choriodecidual is maintained in an immune-tolerant state. Notably the decidual natural killers cells (NKs) present poor cytotoxicity (Riley and Yokoyama, 2008). In non-pregnant women, uterine NKs are implicated in the clearance of endometrial cells during menstruation and of regurgitated endometrial cells in the peritoneum (Moffett and Colucci, 2014). Here, in diseased choriodecidual, a locally altered immune environment may foster the differentiation of endometriotic lesions.

In conclusion, endometriotic-like glandular structures were identified within the fetal membranes of women with past history of severe

endometriosis. The well-known hormonal ovarian blockade occurring during pregnancy was apparently not sufficient to prevent development of endometriotic lesions into the choriodecidual layer. This implies that eutopic diseased endometrium of women with endometriosis has the ability to spontaneously generate endometriotic lesions in contact with non-uterine tissue in a local immunotolerant environment. This may further point toward more general defective immune functions in the endometrium of women with endometriosis, either at a eutopic or ectopic location.

Supplementary data

Supplementary data are available at <http://humrep.oxfordjournals.org/>.

Acknowledgements

We thank Florence Artiguebille, Charlotte Leterme, Isabelle Avril, Sarah Guettouche and Victoria Buth of the CICP I4-19 'Mère-Enfant' of Maternité Port Royal-Cochin for their assistance in recruiting the patients and in collecting of the human tissue samples, as well as the staff of the operating rooms of the Port Royal-Cochin Maternity, the staffs of the platforms 'Genomic' and 'Histim' of the Cochin Institute for their help with the transcriptomic, RT-qPCR, and IHC experiments, and the team of Imaxio, Clermont-Ferrand, France for its help with the methylome experiments.

Authors' roles

L.M. and C.M. conceived, carried out experiments and analyzed data. J.G., C.L. and S.J. carried out experiments and analyzed the data. P.S., C.C., F.G. and D.V. provided crucial ideas, helped with design of experiments and analyzed the data. All authors were involved in writing the paper and had final approval of the submitted versions.

Funding

C.M. and L.M. were supported by a research grant of the AP-HP (CRC I0134).

Conflict of interest

None declared.

References

- Abrao MS, Goncalves MO, Dias JA Jr, Podgaec S, Chamie LP, Blasbalg R. Comparison between clinical examination, transvaginal sonography and magnetic resonance imaging for the diagnosis of deep endometriosis. *Hum Reprod* 2007;**22**:3092–3097.
- Afshar Y, Hastings J, Roqueiro D, Jeong JW, Giudice LC, Fazleabas AT. Changes in eutopic endometrial gene expression during the progression of experimental endometriosis in the baboon, *Papio anubis*. *Biol Reprod* 2013;**88**:44.
- Aghajanova L, Giudice LC. Molecular evidence for differences in endometrium in severe versus mild endometriosis. *Reprod Sci* 2011;**18**:229–251.
- Aghajanova L, Velarde MC, Giudice LC. Altered gene expression profiling in endometrium: evidence for progesterone resistance. *Semin Reprod Med* 2010;**28**:51–58.

- Arimoto T, Katagiri T, Oda K, Tsunoda T, Yasugi T, Osuga Y, Yoshikawa H, Nishii O, Yano T, Taketani Y et al. Genome-wide cDNA microarray analysis of gene-expression profiles involved in ovarian endometriosis. *Int J Oncol* 2003;**22**:551–560.
- Assenov Y, Müller F, Lustik P, Walter J, Lengauer T, Bock C. Comprehensive Analysis of DNA Methylation Data with RnBeads. <http://rnbbeadsmpi-infmpgde>. 2014.
- Benaglia L, Bermejo A, Somigliana E, Scarduelli C, Ragni G, Fedele L, Garcia-Velasco JA. Pregnancy outcome in women with endometriomas achieving pregnancy through IVF. *Hum Reprod* 2012;**27**:1663–1667.
- Borghese B, Mondon F, Noel JC, Fayt I, Mignot TM, Vaiman D, Chapron C. Gene expression profile for ectopic versus eutopic endometrium provides new insights into endometriosis oncogenic potential. *Mol Endocrinol* 2008;**22**:2557–2562.
- Borghese B, Vaiman D, Mondon F, Mbaye M, Anaf V, Noel JC, de Ziegler D, Chapron C. Neurotrophins and pain in endometriosis. *Gynecol Obstet Fertil* 2010;**38**:442–446.
- Breuilier-Fouche M, Leroy MJ, Dubois O, Reinaud P, Chissey A, Qi H, Germain G, Fortier MA, Charpigny G. Differential expression of the enzymatic system controlling synthesis, metabolism, and transport of PGF2 alpha in human fetal membranes. *Biol Reprod* 2010;**83**:155–162.
- Brosens JJ, Parker MG, McIndoe A, Pijnenborg R, Brosens IA. A role for menstruation in preconditioning the uterus for successful pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2009;**200**:615 e611–616.
- Brosens I, Derwig I, Brosens J, Fusi L, Benagiano G, Pijnenborg R. The enigmatic uterine junctional zone: the missing link between reproductive disorders and major obstetrical disorders? *Hum Reprod* 2010;**25**:569–574.
- Brosens I, Brosens JJ, Benagiano G. The eutopic endometrium in endometriosis: are the changes of clinical significance? *Reprod Biomed Online* 2012;**24**:496–502.
- Browne AS, Yu J, Huang RP, Francisco AM, Sidell N, Taylor RN. Proteomic identification of neurotrophins in the eutopic endometrium of women with endometriosis. *Fertil Steril* 2012;**98**:713–719.
- Burney RO, Talbi S, Hamilton AE, Vo KC, Nyegaard M, Nezhat CR, Lessey BA, Giudice LC. Gene expression analysis of endometrium reveals progesterone resistance and candidate susceptibility genes in women with endometriosis. *Endocrinology* 2007;**148**:3814–3826.
- Chapron C, Fauconnier A, Dubuisson JB, Barakat H, Vieira M, Breart G. Deep infiltrating endometriosis: relation between severity of dysmenorrhoea and extent of disease. *Hum Reprod* 2003;**18**:760–766.
- Conti N, Cevenini G, Vannuccini S, Orlandini C, Valensise H, Gervasi MT, Ghezzi F, Di Tommaso M, Severi FM, Petraglia F. Women with endometriosis at first pregnancy have an increased risk of adverse obstetric outcome. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2014; 1–16.
- de Ziegler D, Borghese B, Chapron C. Endometriosis and infertility: pathophysiology and management. *Lancet* 2010;**376**:730–738.
- Eisenberg VH, Zolti M, Soriano D. Is there an association between autoimmunity and endometriosis? *Autoimmun Rev* 2012;**11**:806–814.
- Fernando S, Breheny S, Jaques AM, Halliday JL, Baker G, Healy D. Preterm birth, ovarian endometriomata, and assisted reproduction technologies. *Fertil Steril* 2009;**91**:325–330.
- Fowler PA, Tattum J, Bhattacharya S, Klonisch T, Hombach-Klonisch S, Gazvani R, Lea RG, Miller I, Simpson WG, Cash P. An investigation of the effects of endometriosis on the proteome of human eutopic endometrium: a heterogeneous tissue with a complex disease. *Proteomics* 2007;**7**:130–142.
- Giudice LC. Clinical practice. Endometriosis. *N Engl J Med* 2010;**362**:2389–2398.
- Guerriero S, Ajossa S, Gerada M, Virgilio B, Angioni S, Melis GB. Diagnostic value of transvaginal 'tenderness-guided' ultrasonography for the prediction of location of deep endometriosis. *Hum Reprod* 2008;**23**:2452–2457.
- Harb HM, Gallos ID, Chu J, Harb M, Coomarasamy A. The effect of endometriosis on *in vitro* fertilisation outcome: a systematic review and meta-analysis. *BJOG* 2013;**120**:1308–1320.
- Jin HY, Zhou LS. Ultrastructural change of the ectopic endometrium and its significance in endometriosis. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2010;**30**:1318–1320.
- Jones PA, Liang G. Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nat Rev Genet* 2009;**10**:805–811.
- Kortelahti M, Anttila MA, Hippeläinen MI, Heinonen ST. Obstetric outcome in women with endometriosis—a matched case-control study. *Gynecol Obstet Invest* 2003;**56**:207–212.
- Laschke MW, Giebels C, Menger MD. Vasculogenesis: a new piece of the endometriosis puzzle. *Hum Reprod Update* 2011;**17**:628–636.
- Lessey BA, Lebovic DI, Taylor RN. Eutopic endometrium in women with endometriosis: ground zero for the study of implantation defects. *Semin Reprod Med* 2013;**31**:109–124.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;**25**:402–408.
- Maksimovic J, Gordon L, Oshlack A. SWAN: subset-quantile within array normalization for illumina infinium HumanMethylation450 BeadChips. *Genome Biol* 2012;**13**:R44.
- Moberg C, Bourlev V, Ilyasova N, Olovsson M. Levels of oestrogen receptor, progesterone receptor and alphaB-crystallin in eutopic endometrium in relation to pregnancy in women with endometriosis. *Hum Fertil (Camb)* 2014;1–8.
- Moffett A, Colucci F. Uterine NK cells: active regulators at the maternal-fetal interface. *J Clin Invest* 2014;**124**:1872–1879.
- Norwitz ER, Fernandez-Shaw S, Barlow DH, Starkey PM. Expression of intermediate filament in endometrial glands changes with the onset of pregnancy and in endometriosis. *Hum Reprod* 1991;**6**:1470–1473.
- Piketny M, Chopin N, Dousset B, Millischer-Bellaische AE, Roseau G, Leconte M, Borghese B, Chapron C. Preoperative work-up for patients with deeply infiltrating endometriosis: transvaginal ultrasonography must definitely be the first-line imaging examination. *Hum Reprod* 2009;**24**:602–607.
- Pruunsild P, Kazantseva A, Aid T, Palm K, Timmusk T. Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. *Genomics* 2007;**90**:397–406.
- Riley JK, Yokoyama WM. NK cell tolerance and the maternal-fetal interface. *Am J Reprod Immunol* 2008;**59**:371–387.
- Ritchie ME, Diyagama D, Neilson J, van Laar R, Dobrovic A, Holloway A, Smyth GK. Empirical array quality weights in the analysis of microarray data. *BMC Bioinformatics* 2006;**7**:261.
- Santulli P, Marcellin L, Noel JC, Borghese B, Fayt I, Vaiman D, Chapron C, Mehats C. Sphingosine pathway deregulation in endometriotic tissues. *Fertil Steril* 2012;**97**:904–911.
- Santulli P, Borghese B, Noel JC, Fayt I, Anaf V, de Ziegler D, Batteux F, Vaiman D, Chapron C. Hormonal therapy deregulates prostaglandin-endoperoxidase synthase 2 (PTGS2) expression in endometriotic tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;**99**:881–890.
- Simon A, Biot E. ANAIS: analysis of NimbleGen arrays interface. *Bioinformatics* 2010;**26**:2468–2469.
- Stanek J. Hypoxic patterns of placental injury: a review. *Arch Pathol Lab Med* 2013;**137**:706–720.
- Stephansson O, Kieler H, Granath F, Falconer H. Endometriosis, assisted reproduction technology, and risk of adverse pregnancy outcome. *Hum Reprod* 2009;**24**:2341–2347.
- Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;**102**:15545–15550.
- Vercellini P, Parazzini F, Pietropaolo G, Cipriani S, Frattaruolo MP, Fedele L. Pregnancy outcome in women with peritoneal, ovarian and rectovaginal endometriosis: a retrospective cohort study. *BJOG* 2012;**119**:1538–1543.

- Vercellini P, Vigano P, Somigliana E, Fedele L. Endometriosis: pathogenesis and treatment. *Nat Rev Endocrinol* 2014; **10**:261–275.
- Wagner JR, Busche S, Ge B, Kwan T, Pastinen T, Blanchette M. The relationship between DNA methylation, genetic and expression inter-individual variation in untransformed human fibroblasts. *Genome Biol* 2014; **15**:R37.
- Wessels JM, Wu L, Leyland NA, Wang H, Foster WG. The brain-uterus connection: brain derived neurotrophic factor (BDNF) and its receptor (ntrk2) are conserved in the Mammalian uterus. *PLoS One* 2014; **9**:e94036.
- Yang X, Martin TA, Jiang WG. Biological influence of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on colon cancer cells. *Exp Ther Med* 2013; **6**:1475–1481.

4 CONCLUSIONS

Au cours d'une grossesse normale menée à terme, les trophoblastes du chorion recouvrant le col changent de phénotype et présentent les haplotypes d'origine paternelle capable d'activer les cellules immunitaires maternelles. Cette perte de l'état tolérogène du tissu maternel survient directement au niveau du site de rupture des membranes, et se poursuit par un embrasement cytokinique responsable *in fine* d'inflammation qui serait plutôt une conséquence de l'initiation de la parturition et non son *primum movens*.

Chez les femmes atteintes d'endométriose, des structures glandulaires de type endométriosique peuvent se développer au contact des membranes fœtales. Le blocage hormonal ovarien survenant pendant la grossesse ne semble pas suffisant pour prévenir la formation de lésions d'endométriose dans la choridodécidue. Cela implique que l'endomètre des femmes atteintes d'endométriose a la capacité de générer des lésions d'endométriose spontanément au contact d'un tissu allogénique dans un environnement localement immuno-tolérant et de façon hormono-indépendante. Ces observations suggèrent que des fonctions immunitaires seraient défectueuses dans l'endomètre de femmes atteintes d'endométriose.

Plus qu'un timing tributaire d'une horloge placentaire ou déciduale, et indépendamment des concentrations sériques des hormones stéroïdiennes, le contrôle de la durée de la grossesse apparaît être un système verrouillé d'un point de vue immunologique dépendant de l'endomètre maternel. Le processus de parturition serait la conséquence d'une maturation moléculaire et tissulaire des tissus gestationnels dont l'activation pourrait s'apparenter aux phénomènes de résonance mécanique, où le système stimulé atteindrait un point de rupture, correspondant à la mise en route du travail.

En 2000, 10 ans avant sa mort, Graham Ligging espérait connaître un jour la clé du mystère de parturition, grâce à l'arrivée des nouveaux outils de la biologie moléculaire [193].

Quinze ans plus tard, même secrètement, je me garde bien d'entretenir cet espoir.

PARTIE 3 : PERSPECTIVES

Ces travaux de recherche fondamentale se prolongent actuellement par deux études cliniques actuellement en cours : l'étude Trohy2 et l'étude EndObst. Ces deux études ont pour but d'identifier des femmes à risque d'accouchement prématuré. Elles permettront de mieux informer les femmes à risque et pourront servir à identifier celles pour qui des mesures prophylactiques adaptées pourraient être anticipées. Inversement, elle permettra de réduire des prises en charges de femmes pour qui ces mesures ne seraient pas nécessaires.

4.1 **Trophy2 : marqueurs du remodelage choriodecidual dans les sécrétions cervico-vaginales**

L'étude Trophy2 est une étude qui vise à identifier de nouveaux marqueurs d'accouchement prématuré dans les sécrétions cervico-vaginales. Il s'agit d'une étude financée dans le cadre des POC de l'Institut Cochin et par la Valorisation de l'APHP.

L'étude sur la parturition dans l'espèce humaine portant sur les membranes fœtales nous a permis d'identifier treize gènes codant pour des protéines sécrétées impliquées dans le remodelage et la réparation de la matrice extracellulaire qui ont une expression significativement accrue de plus de deux fois avant et après le début du travail. Ces résultats nous ont incité à étudier si les protéines codées par ces gènes pouvaient être détectées dans les fluides cervico-vaginaux afin de servir de nouveaux biomarqueurs de prédiction de l'accouchement prématuré.

Nous avons mis en place une cohorte prospective monocentrique de femmes en MAP afin de valider la pertinence de nouvelles molécules en vue d'identifier dans cette population de femmes à risque celles qui accoucheront effectivement prématurément.

Une étude préalable (contrôle positif/ contrôle négatif) a permis la mise au point du test multiplex à partir d'une cohorte prospective monocentrique de femmes enceintes accouchant à terme par césarienne avant travail au décours d'une grossesse normale -sujets contrôle positif-. Vérification de l'absence de ces molécules dans les prélèvements vaginaux de femmes hors grossesse ou en cours d'une grossesse sans complication avant le terme (lors de la première et la dernière consultation d'obstétrique) – sujets contrôle négatif –.

Notre objectif est de montrer que la présence dans les sécrétions cervico-vaginales de protéines identifiées lors de l'étude *in vitro* est associée à un accouchement dans les 14 jours suivants et également associée à une augmentation significative d'issues obstétricale et/ ou néonatale défavorables avant 34 SA.

4.2 **EndObst : étude prospective multicentrique des conséquence périnatales de l'endométriiose**

L'étude EndObst vise à étudier les conséquences périnatales de l'endométriiose. Il s'agit d'une étude prospective comparative multicentrique financée dans le cadre du PHRC régional en 2014.

L'objectif de l'étude est de rechercher s'il existe un lien entre l'endométriiose et l'accouchement prématuré, avant 37 SA, et de vérifier que ce lien est observé pour tous les phénotypes de l'atteinte endométriosique. Nous voulons également vérifier s'il existe un lien avec la survenue d'une rupture prématurée des membranes, d'une perte fœtale avant 22 SA, d'un retard de croissance intra-utérin, d'une prématurité induite ou spontanée, d'une prééclampsie, d'un placenta *praevia*, d'une hémorragie de la délivrance. Enfin, nous évaluerons le risque de complication opératoire en cas de césarienne.


Savoir s'il existe une relation entre la sévérité de l'endométriiose et la survenue de complications obstétricales et périnatales permettrait d'identifier les femmes ayant un risque augmenté en fonction de leurs antécédents. La stratégie de prise en charge anténatale pourrait être adaptée de façon appropriée en tenant compte du niveau de risque et avoir un impact bénéfique sur la grossesse en fonction de la sévérité.

ANNEXES

Annexe 1

[Biochemistry of fetal membranes rupture]. Méhats C, Schmitz T, **Marcellin L**, Breuiller-Fouché M. Gynecol Obstet Fertil. 2011



Disponible en ligne sur
 ScienceDirect
 www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

 www.em-consulte.com



Rupture des membranes fœtales (GREP, Paris, 8 octobre 2010)

Biochimie de la rupture des membranes fœtales

Biochemistry of fetal membranes rupture

C. Méhats^{a,*}, T. Schmitz^b, L. Marcellin^a, M. Breuiller-Fouché^a

^a Inserm U1016, institut Cochin, département génétique et développement, faculté de médecine Cochin, 24, rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75014 Paris, France

^b Service de gynécologie obstétrique, hôpital Robert-Debré, AP-HP, 48, boulevard Serrurier, 75019 Paris, France

INFO ARTICLE

Historique de l'article :

Reçu le 17 janvier 2011

Accepté le 7 février 2011

Mots clés :

Amnios

Chorion

Collagène

Métalloprotéases

Apoptose

Limite élastique

Keywords:

Amnion

Chorion

Collagen

Metalloproteases

Apoptosis

Elastic limit

RÉSUMÉ

Les membranes fœtales, amnios et chorion, tapissent la cavité amniotique et sont essentielles pour son intégrité jusqu'au terme normal de la grossesse. Elles ont une structure pluristratifiée dont la composition garantit leur cohésion et leur élasticité. Leur fonction princeps est de retenir le liquide amniotique fluctuant dans une cavité semi-rigide. Leur limite élastique dépend de l'organisation de la matrice extracellulaire et principalement du type de collagène qui la compose. Le feuillet compact de l'amnios, responsable de la limite élastique, contient majoritairement du collagène de type I organisé en treillis, lui permettant de s'allonger ou de s'épandre. La couche spongieuse sous-jacente, principalement du collagène de type III, est organisée en un maillage, lâche et riche en protéoglycanes hydratés, qui absorbe les chocs et autorise l'amnios à glisser sur le chorion. La séquence d'événements entraînant la rupture comprend : (i) la distension des membranes avec perte d'élasticité, (ii) la séparation de l'amnios et du chorion, (iii) la fracture du chorion, (iv) la distension de l'amnios qui fait hernie, (v) la rupture de l'amnios. Le mécanisme de rupture a longtemps été considéré comme consécutif aux contractions utérines. Cependant l'observation avant le travail d'une zone de morphologie altérée en regard du col, avec des variations biochimiques (modifications des activités métalloprotéases et des protéoglycanes, apoptose...) associées à une faiblesse physique focale suggère une programmation de la rupture avant la parturition. Une meilleure compréhension des mécanismes biochimiques de la rupture des membranes pourra apporter un éclairage nouveau sur les moyens d'anticiper et d'intervenir sur les risques de rupture prématurée.

© 2011 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

ABSTRACT

Fetal membranes, amnion and chorion, line up the amniotic cavity and are essential for its integrity towards normal term of pregnancy. They consist of a pluristratified structure whose composition assures their cohesion and elasticity. They firstly function in retaining the fluctuant amniotic fluid in a half-rigid cavity. Their elastic limit depends on the organization of the extracellular matrix and firstly on the collagen type it contains. The compact layer of the amnion, responsible for the elastic limit, contains mainly type I collagen, organized in lattice; this allows elongation or spreading. Underneath, the spongy layer, principally of collagen III, is organized in a loose mesh, enriched in hydrated proteoglycans, which allows the absorption of the shocks and the sliding of the amnion on the chorion. The cascade of events leading to the membrane rupture displays: (i) membranes distension with elasticity loss, (ii) separation of the chorion from the amnion, (iii) chorion fracture, (iv) amnion distension which produces an hernia, (v) amnion rupture. The rupture mechanism was long thought to be a consequence of uterine contractions. However, the observation before labour of a zone of altered morphology, with biochemical variations (modifications of metalloprotease activity and of proteoglycans, apoptosis...) associated with focal physical weakness in the region overlying the cervix suggests programming of the rupture before parturition. A better understanding of the biochemical mechanisms of membranes rupture will provide new insights into how to anticipate and to intervene in the case of risk of premature rupture.

© 2011 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : celine.mehats@inserm.fr (C. Méhats).

1. Introduction

La rupture prématurée des membranes est une cause majeure de morbidité périnatale ; leur intégrité doit être assurée jusqu'au terme normal de la grossesse. Situées à l'interface fœto-maternelle, les membranes ont une structure pluristratifiée, élaborée autour d'une architecture biochimique particulière qui leur confère la capacité de se distendre et leur permet de s'adapter à l'expansion du volume fœtal et amniotique liée au déroulement normal de la grossesse. La rupture à terme ou avant terme est conditionnée par des modifications de cette structure, induites par des processus progressifs de maturation ou d'induction inflammatoire en cas d'infection. La description de ces phénomènes moléculaires permet d'appréhender de façon rationnelle la physiopathologie de la rupture prématurée des membranes.

2. Structure des membranes

À terme, les membranes fœtales humaines ont une surface d'environ 1500 cm² pour une épaisseur de 200 à 300 µm [1]. Trente pour cent de cette surface recouvrent le placenta et 70 % interagissent avec la décidue maternelle et représentent les membranes réfléchies. Ces dernières tapissent la cavité amniotique qui contient le fœtus et le liquide amniotique. Elles ont une structure complexe, multistratifiée et leur composition biochimique propre leur assure un pouvoir expansif et une élasticité qui garantit, d'une part, une croissance fœtale harmonieuse et, d'autre part, une absorption des chocs. La structure des membranes est définitive au quatrième mois de grossesse ; elles sont composées de deux feuillets accolés, distincts histologiquement : l'amnios et le chorion (Fig. 1) [2,3]. L'amnios sur le versant de la cavité amniotique, au contact du liquide amniotique, comprend un épithélium unistratifié cubique non cilié, qui s'appuie sur le mésoderme amniotique. Celui-ci contient une couche compacte et une couche fibroblastique. Le chorion, plus externe, est en contact étroit avec la décidue. Cette interface fœto-maternelle forme un enchevêtrement tel que le chorion et la décidue sont difficilement dissociables et sont alors désignés sous le terme de chorio-décidue dans la plupart des travaux. Le feuillet chorionique est composé du mésoderme chorionique appelé couche réticulée et d'un épithélium chorionique, pluristratifié, qui comprend des cellules

trophoblastiques rondes à polygonales, reposant sur une pseudo lame basale. Les cellules les plus proches de la lame basale adhèrent fortement les unes aux autres. Plus avant dans la décidue maternelle, les trophoblastes sont plus disséminés dans une matrice extracellulaire dense et des villosités dégénérées peuvent y être observées. Une zone intermédiaire sépare l'amnios du chorion : la couche spongieuse, réseau fibrillaire fin et dispersé.

3. Fonction des membranes

La fonction princeps des membranes est de retenir le liquide amniotique dans une cavité, ajustable au flux du liquide amniotique généré par la croissance constante du fœtus et par ses mouvements. Par leur localisation, les membranes sont soumises à deux contraintes principales : les étirements de la cavité amniotique et l'inertie relative du myomètre. La limite élastique des membranes et leur adaptation au stress physique dépendent de l'organisation des feuillets de leur matrice extracellulaire. La nature des collagènes qui les composent et leur interaction avec des protéines adhésives et avec des protéoglycannes sont garantes des propriétés à la fois cohésives et extensibles des membranes.

Le feuillet compact de l'amnios contient majoritairement du collagène de type I et est responsable de la force limite élastique des membranes [4]. Ce collagène de type I est de nature fibrillaire et s'organise en treillis. Ce treillis lui permet à la fois de s'allonger et de s'affiner, ou de s'épandre avec une certaine limite intrinsèque (Fig. 2). Il repose sur la couche fibroblastique amorphe au contact de la couche spongieuse. Cette couche contient principalement du collagène de type III et est organisée en un maillage lâche, riche en protéoglycannes hydratés. La présence des molécules d'eau au sein de la structure souple de ce réseau lui permet d'absorber les chocs. Il autorise le feuillet amniotique, rendu semi-rigide par son feuillet compact, à glisser sur le chorion fixé par la décidue au myomètre adjacent.

L'intégrité des membranes au décours de la grossesse peut être ainsi assimilée de manière simplifiée à un maintien des contacts entre le feuillet compact sur le feuillet spongieux et celui-ci dépend essentiellement de la teneur et de la qualité de leurs collagènes.

4. Biochimie des collagènes

Les collagènes sont synthétisés principalement par les fibroblastes, mais aussi les cellules épithéliales. Ils se caractérisent par une séquence répétée GLY-X-Y, ou X est très fréquemment la proline et Y l'hydroxyproline [5]. La présence de la glycine dans tous les trois résidus impose à la chaîne peptidique de collagène de se disposer en hélice qui est stabilisée grâce à la conformation en anneau de la proline et de l'hydroxyproline. Chaque molécule de collagène contient trois chaînes peptidiques qui s'enroulent les unes sur les autres pour former une triple hélice. La nature des chaînes de collagène définit le type de collagène formé. Le collagène est d'abord synthétisé sous forme d'une protéine précurseur : le procollagène, soluble dans la cellule (Fig. 3). Les fibres de collagène commencent à s'assembler dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Des prolines spécifiques y sont hydroxylées par une proline hydroxylase en hydroxyproline. Le groupe -OH de ces résidus modifiés aide à stabiliser la triple hélice de collagène en formant des liaisons hydrogènes entre les chaînes polypeptidiques. Ce collagène immature est protégé, par ailleurs, par des protéines chaperonnes HSP47 ou serpinH1. Le procollagène est alors sécrété dans l'espace extracellulaire où des enzymes extracellulaires clivent le prodomaine. Les molécules de collagène polymérisent pour former des fibrilles. L'oxydation de lysines spécifiques par la lysyl-oxydase forme des aldéhydes

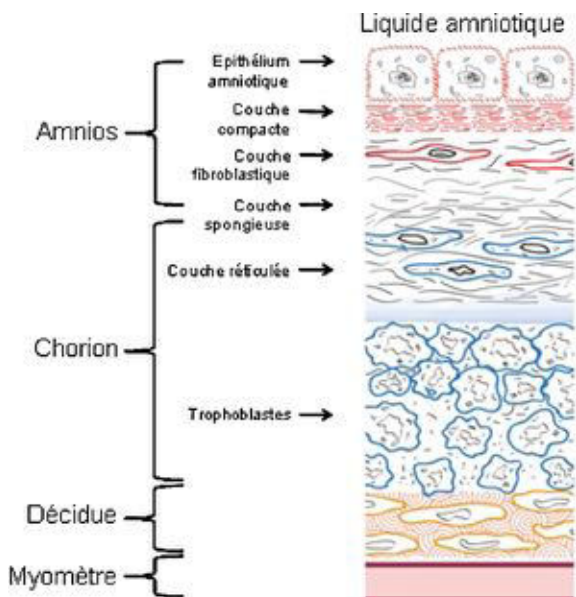


Fig. 1. Structure des membranes fœtales humaines. L'amnios est orienté vers le liquide amniotique ; le chorion repose sur la décidue maternelle. Adapté de [25].

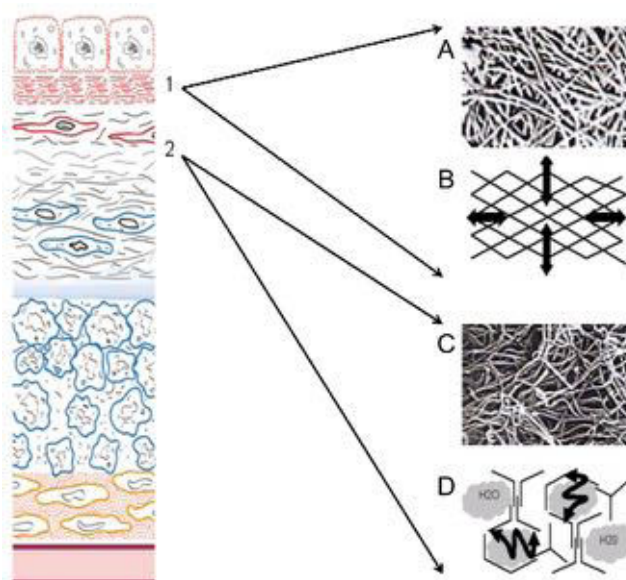


Fig. 2. Organisation tridimensionnelle des collagènes des couches compacte et spongieuse. (1) Dans la couche compacte, le collagène est principalement du collagène de type i. Il est fibrillaire, organisé strictement en un réseau formant un maillage en treillis, à l'origine de la force élastique limite des membranes. (2) Dans la couche spongieuse, le collagène, principalement de type iii, est organisé en un réseau lâche hydraté, qui autorise une déformation élastique. (A) Micrographie électronique de la couche compacte, adaptée de [25]. (B) Représentation schématique du réseau en treillis. (C) Micrographie électronique de la couche spongieuse, adaptée de [25]. (D) Représentation schématique du réseau tache.

réactifs qui sont impliqués dans la formation de liaisons croisées entre différentes molécules de collagène, stabilisant la fibrille.

La dégradation des collagènes est assurée principalement par les métalloprotéases de la matrice ou MMPs, qui sont inhibées par des inhibiteurs spécifiques du tissu ou *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs) [6]. Les MMPs sont des protéases appartenant à une famille d'enzymes produites par différents types cellulaires qui hydrolysent au moins un composé de la matrice extracellulaire. En raison de la variété de spécificités de substrats, le catabolisme de la matrice extracellulaire nécessite une action concertée de plusieurs MMPs. Par exemple, MMP1 et MMP8 clivent la triple hélice des collagènes fibrillaires, qui sont alors dégradés par les gélatinases MMP2 et MMP9. Ces gélatinases clivent aussi le collagène de type IV, la fibronectine et les protéoglycanes. Les TIMPs forment des complexes de stœchiométrie 1 :1 avec les MMPs et inhibent leur activité enzymatique. TIMP1 se fixe aux MMP1, MMP8 et MMP9 activées, TIMP2 se fixe sur la forme latente ou active de MMP2, et TIMP3 plus récemment décrite agirait comme TIMP1. L'intégrité des membranes fœtales se maintient au cours de la grossesse en partie grâce à la combinaison des activités MMP1 et MMP9 faibles et une concentration relativement importante de TIMP1 [6].

5. Mécanismes de rupture

La séquence des événements entraînant la déchirure des membranes comprend : (i) la distension des membranes avec perte d'élasticité, (ii) la séparation de l'amnios et du chorion au niveau de la couche spongieuse, (iii) la fracture du chorion, (iv) la distension de l'amnios qui fait hernie par la déchirure du chorion, (v) la rupture de l'amnios (Fig. 4) [7]. La rupture a normalement lieu après le début des contractions. Le mécanisme de rupture des membranes à terme a longtemps été attribué à une diminution de la force limite élastique des membranes, consécutive aux contractions utérines responsables d'étirements répétés. Mais dans 10 % des accouchements à terme et dans 40 % des accouchements prématurés, la rupture survient avant les

contractions. Cette observation a conduit à reconsidérer la zone de morphologie altérée recouvrant le col utérin et le segment inférieur observée en fin de gestation avant le début du travail, initialement décrite par le groupe de Bell [2]. Cette zone présente des modifications de la matrice extracellulaire, un feuillet trophoblastique aminci, avec une augmentation de l'activité MMP et une apoptose des trophoblastes [8–10]. La couche spongieuse est gonflée et œdémateuse et les réseaux de fibres de collagènes sont interrompus. Plus récemment, des variations biochimiques ont été observées dans cette zone qui expliquent l'aspect histologique. Ainsi, la quantité de décorine, un protéogly-

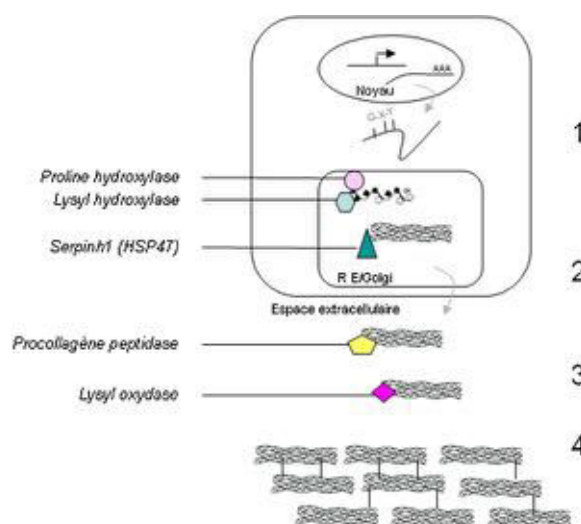


Fig. 3. Étapes de la synthèse du collagène. (1) Trois chaînes peptidiques de collagène sont synthétisées et s'assemblent dans le réticulum endoplasmique et le Goigi. (2) Elles prennent la forme d'une triple hélice stabilisée par l'hydroxylation des prolines qui constitue le procollagène. Des protéines chaperonnes serpinH1 protègent ce collagène immature. (3) Le procollagène est sécrété dans l'espace extracellulaire où il est clivé, ce qui le rend insoluble et induit l'assemblage spontané des fibrilles de collagène. (4) Les lysines sont oxydées; cela favorise les liaisons interfibrilles qui stabilisent la fibre de collagène.

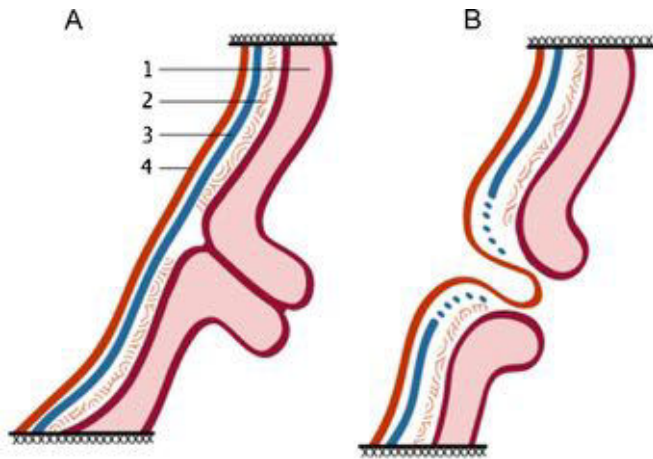


Fig. 4. Mécanismes de rupture des membranes. (A) Pendant la grossesse, les membranes accolées tapissent la cavité utérine. Une zone de morphologie altérée en regard du col utérin apparaît en fin de gestation. (B) Dans le mécanisme de rupture, le chorion se déchire en premier. L'amnios distendu fait hernie dans la brèche du chorion et va se rompre. 1 : col utérin ; 2 : décidue ; 3 : chorion ; 4 : amnios.

cane qui lie le collagène fibrillaire et l'organise en faisceaux, est diminuée alors que le biglycan, un autre protéoglycane qui déstabilise ces faisceaux en interférant avec la décorine, est retrouvé en quantité accrue [11,12]. La quantité d'acide hyaluronique, qui absorbe de l'eau et induit alors une augmentation de la pression tissulaire dans la matrice extracellulaire, est augmentée de trois fois dans cette zone en regard du col [12]. MMP9 y est aussi induit alors que TIMP3 est réprimé [13]. Par ailleurs, un index biochimique de l'apoptose peut y être observé : le clivage de la poly(ADP-Ribose)Polymerase (PARP) [13]. Ces variations biochimiques et histologiques ont été associées à une diminution de la force limite élastique au niveau de ce site [13]. De plus, l'amnios et

le chorion sont décollés sur une partie importante de cette zone [14]. Or, le chorion est moins résistant aux tensions lorsqu'il est séparé de l'amnios [13]. La libération de fragments de collagène qui sont reconnus à la surface des cellules chorioniques va aussi induire l'apoptose et la surproduction de MMPs, créant une boucle d'amplification aboutissant à la rupture. De surcroît, ces fragments de collagène vont induire une réaction inflammatoire avec production de cytokines comme $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ et $IL-6$, qui vont fragiliser plus avant les membranes (Fig. 5).

6. Ruptures physiopathologiques

La fragilisation physiologique des membranes résulte d'un processus débuté plus tôt au cours de la grossesse impliquant la maturation progressive et synchrone des tissus gestationnels à l'approche du terme. Cette harmonie est cependant parfois perturbée et entraîne la rupture prématurée. Le mécanisme physiopathologique de rupture est une entité complexe et peut résulter de quatre grandes causes.

Un défaut de structure de la matrice et en particulier des collagènes est un facteur de risque de rupture des membranes [15]. Les fœtus atteints du syndrome Ehlers-Danlos, un groupe d'environ 11 maladies génétiques du tissu conjonctif, dues à des mutations des gènes des collagènes, sont à haut risque de naître prématurément suite à une rupture prématurée des membranes. Des déficits nutritionnels peuvent aussi être à l'origine d'une rupture prématurée. Notamment une carence en vitamine C est en théorie associée à un risque accru de rupture des membranes. La vitamine C par son pouvoir anti-oxydant maintient les chaînes de procollagène en forme réduite dans le cytoplasme, ce qui favorise les ramifications dans la fibre de collagène et donc sa stabilité. D'autre part, de nombreuses enzymes ont comme co-facteurs des métaux tels que le zinc ou le cuivre qui sont d'origine nutritionnelle. Ainsi la lysyl-oxydase extracellulaire a comme co-facteur le cuivre. L'existence de polymorphismes des gènes impliqués dans la synthèse du collagène commence aujourd'hui à

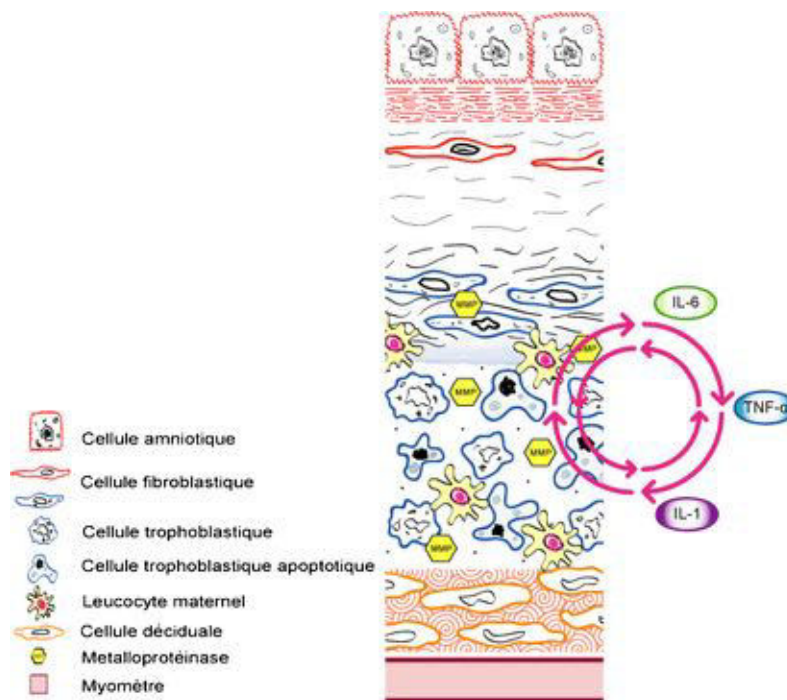


Fig. 5. Modifications histologiques et biochimiques dans la zone de morphologie altérée en regard du col. La matrice extracellulaire est dispersée au niveau de la couche spongieuse et le chorion est aminci. De nombreux trophoblastes sont entrés en apoptose et les leucocytes maternels envahissent le chorion. Les MMPs sont induites ainsi que la production de cytokines qui entretiennent une réaction inflammatoire jusqu'à la rupture.

être aussi appréciée comme facteur de risque de rupture. Une étude a montré l'association avec une rupture prématurée d'un polymorphisme particulier du promoteur du gène SERPINH1, codant pour la protéine hsp47, une protéine chaperonne qui protège le procollagène immature [16].

Une deuxième cause reconnue de rupture prématurée des membranes est d'origine mécanique : dans le cas des grossesses multiples ou d'hydramnios, le volume trop important de la cavité amniotique est responsable d'un étirement mécanique des membranes fœtales. Il augmente la production de prostaglandines et de MMP1 par les cellules amniotiques, qui sont responsables de microfractures de la matrice extracellulaire. Ces phénomènes sont à l'origine de la libération de fragments peptidiques signaux qui induisent l'apoptose des fibroblastes de la matrice.

La troisième cause est le décollement placentaire qui provoque, à l'interface chorio-déciduale, une hémorragie locale induisant la cascade de la coagulation, avec augmentation de la thrombine, de la plasmine qui *in fine* active des MMPs.

La quatrième cause, la mieux documentée, est l'infection/inflammation intra-utérine [17]. Une infection du liquide amniotique et une chorioamniotite histologique peuvent être retrouvées dans la moitié des cas de rupture prématurée des membranes. Les protéases produites par les bactéries et les toxines bactériennes ont été proposées comme agents causaux de la rupture. Cependant, alors que l'infection bactérienne pourrait initier le mécanisme de rupture, il semble que c'est la réponse inflammatoire de l'hôte qui soit véritablement responsable de celle-ci. S'ensuivent la production de cytokines et de chémokines, l'afflux et l'activation de leucocytes et la production de prostaglandines et MMPs. Les leucocytes recrutés ont aussi une activité protéolytique et l'absence d'un inhibiteur naturel de l'élastase du neutrophile, *proteinase inhibitor 3* (PI3), a été montrée en association à une chorioamniotite sévère et une rupture prématurée des membranes [18]. De plus, de nombreux polymorphismes sont maintenant décrits dans les gènes impliqués dans la réponse immune innée, graduant selon les individus l'intensité et/ou la durée de la réponse. Certains polymorphismes particuliers contrôlant des variations génétiques ou épigénétiques sont associés à un risque accru de rupture prématurée des membranes, comme dans les gènes de TNF α , IL-1 β , MMP1, MMP8 et MMP9 [19–24].

7. Conclusion

L'intégrité des membranes est intimement liée à leur structure complexe pluristratifiée qui assure la fonction d'enveloppe cohésive et élastique de la cavité amniotique. Les interactions biochimiques entre les collagènes et les enzymes produites par les cellules des membranes en réponse à différents stimuli sont responsables d'une modification de la structure et de la conformation de la matrice. Au final, elles induisent une fragilisation des membranes et leur rupture. La rupture prématurée des membranes est un événement potentiellement délétère pour la mère et son fœtus. Une vision moderne de la biochimie de la rupture des membranes ouvre les portes à des progrès dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans le risque de rupture et dans sa prise en charge clinique.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Bourne GL. The microscopic anatomy of the human amnion and chorion. *Am J Obstet Gynecol* 1960;79:1070–3.
- [2] Malak TM, Bell SC. Structural characteristics of term human fetal membranes: a novel zone of extreme morphological alteration within the rupture site. *Br J Obstet Gynaecol* 1994;101:375–86.
- [3] Parry S, Strauss JF. Premature rupture of the fetal membranes. *N Engl J Med* 1998;338:663–70.
- [4] Oyen ML, Calvin SE, Landers DV. Premature rupture of the fetal membranes: is the amnion the major determinant? *Am J Obstet Gynecol* 2006;195:510–5.
- [5] Gordon MK, Hahn RA. Collagens. *Cell Tissue Res* 2010;339:247–57.
- [6] Cockle JV, et al. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in preterm perinatal complications. *Reprod Sci* 2007;14:629–45.
- [7] Arikat S, et al. Separation of amnion from choriodecidua is an integral event to the rupture of normal term fetal membranes and constitutes a significant component of the work required. *Am J Obstet Gynecol* 2006;194:211–7.
- [8] McLaren J, Malak TM, Bell SC. Structural characteristics of term human fetal membranes prior to labour: identification of an area of altered morphology overlying the cervix. *Human Reprod* 1999;14:237–41.
- [9] McLaren J, Taylor DJ, Bell SC. Increased incidence of apoptosis in non-labour-affected cytotrophoblast cells in term fetal membranes overlying the cervix. *Human Reprod* 1999;14:2895–900.
- [10] McLaren J, Taylor DJ, Bell SC. Increased concentration of pro-matrix metalloproteinase 9 in term fetal membranes overlying the cervix before labor: implications for membrane remodeling and rupture. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182:409–16.
- [11] Meinert M, et al. Proteoglycans and hyaluronan in human fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184:679–85.
- [12] Meinert M, et al. Labour induces increased concentrations of biglycan and hyaluronan in human fetal membranes. *Placenta* 2007;28:482–6.
- [13] El Khwad M, et al. Term human fetal membranes have a weak zone overlying the lower uterine pole and cervix before onset of labor. *Biol Reprod* 2005;72:720–6.
- [14] Strohl A, et al. Decreased adherence and spontaneous separation of fetal membrane layers–amnion and choriodecidua—a possible part of the normal weakening process. *Placenta* 2010;31:18–24.
- [15] Anum EA, et al. Connective tissue and related disorders and preterm birth: clues to genes contributing to prematurity. *Placenta* 2009;30:207–15.
- [16] Wang H, et al. A functional snp in the promoter of the serpinh1 gene increases risk of preterm premature rupture of membranes in African Americans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:13463–7.
- [17] Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med* 2000;342:1500–7.
- [18] Tromp G, et al. Genome-wide expression profiling of fetal membranes reveals a deficient expression of proteinase inhibitor 3 in premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:1331–8.
- [19] Ferrand PE, et al. A polymorphism in the matrix metalloproteinase-9 promoter is associated with increased risk of preterm premature rupture of membranes in African Americans. *Mol Hum Reprod* 2002;8:494–501.
- [20] Genc MR, et al. Polymorphism in the interleukin-1 gene complex and spontaneous preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 2002;187:157–63.
- [21] Hartel C, et al. Polymorphisms of genes involved in innate immunity: association with preterm delivery. *Mol Hum Reprod* 2004;10:911–5.
- [22] Menon R, et al. Multilocus interactions at maternal tumor necrosis factor-alpha, tumor necrosis factor receptors, interleukin-6 and interleukin-6 receptor genes predict spontaneous preterm labor in European-American women. *Am J Obstet Gynecol* 2006;194:1616–24.
- [23] Wang H, et al. Genetic and epigenetic mechanisms combine to control mmp1 expression and its association with preterm premature rupture of membranes. *Hum Mol Genet* 2008;17:1087–96.
- [24] Wang H, et al. Functionally significant snp mmp8 promoter haplotypes and preterm premature rupture of membranes (pprom). *Hum Mol Genet* 2004;13:2659–69.
- [25] Schmidt W. The amniotic fluid compartment: the fetal habitat. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 1992;127:1–100.

Annexe 2 :

[Comparison of two bedside tests performed on cervicovaginal fluid to diagnose premature rupture of membranes]. **Marcellin L**, Anselem O, Guibourdenche J, De la Calle A, Deput-Rampon C, Cabrol D, Tsatsaris V. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris). 2011



Disponible en ligne sur
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



TRAVAIL ORIGINAL

Analyse comparative de deux tests diagnostiques de rupture prématurée des membranes dans les sécrétions cervico-vaginales

Comparison of two bedside tests performed on cervicovaginal fluid to diagnose premature rupture of membranes

L. Marcellin^{a,*}, O. Anselem^a, J. Guibourdenche^{b,c}, A. De la Calle^a,
C. Deput-Rampon^a, D. Cabrol^{a,c}, V. Tsatsaris^{a,c}

^a Maternité Port-Royal, hôpital Cochin Saint-Vincent-de-Paul, AP-HP, université Paris Descartes, 123, boulevard de Port-Royal, 75014 Paris, France

^b Département d'endocrinologie, université Paris Descartes, hôpital Cochin Saint-Vincent-de-Paul, AP-HP, 75014 Paris, France

^c Fondation PremUP, 4, avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France

Reçu le 9 mars 2011 ; avis du comité de lecture le 4 juin 2011 ; définitivement accepté le 14 juin 2011

MOTS CLÉS

Rupture prématurée
des membranes ;
IGFBP-1 ;
PAMG-1

Résumé

Objectif. – Comparer les performances de deux tests diagnostiques rapides de rupture prématurée des membranes reposant sur la détection de la placental α -microglobulin-1 (PAMG-1) et de l'insuline-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) dans les sécrétions cervico-vaginales. **Méthode.** – Étude cas-témoin prospective. Les patientes consultant pour une perte franche de liquide amniotique (groupe 1) ou pour un motif autre sans perte de liquide (groupe 2), entre 24 et 41^{1/7} semaines d'aménorrhée (SA), ont été incluses dans l'étude. Successivement, le test AmniSure[®] (PAMG-1) sans spéculum, puis le test Actim[™]Prom (IGFBP-1) au cours de l'examen au spéculum ont été pratiqués pendant la même consultation.

Résultats. – Quarante-vingts patientes (40 dans chaque groupe) ont été incluses entre 25^{1/7} SA et 41^{1/7} SA. Le test AmniSure[®] a une sensibilité de 95 % (82,4–99,4), une spécificité de 94,8 % (79,3–98), une valeur prédictive positive de 95 % (84,7–100) et une valeur prédictive négative de 94,8 % (87,9–100). Le test diagnostique Actim[™]Prom a une sensibilité de 97,5 % (85,7–100), une spécificité de 97,4 % (82,4–99,4), une valeur prédictive positive de 97,5 % (88,5–100) et une valeur prédictive négative de 97,4 % (92,5–100).

Conclusion. – Les deux tests ont une performance comparable pour le diagnostic de rupture prématurée des membranes.

© 2011 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : louismarcellin@hotmail.com (L. Marcellin).

Annexe 3 :

Are biological markers relevant for the diagnosis and the prognosis of preterm premature rupture of membranes (PPROM)? **Marcellin L**, Goffinet F. Clin Chem Lab Med. 2012

Mini Review

Are biological markers relevant for the diagnosis and the prognosis of preterm premature rupture of membranes (PPROM)?

Louis Marcellin^{1,3} and François Goffinet^{1,2,*}

¹Paris-Descartes University, Maternité Port Royal, Paris, France

²INSERM U953, Epidemiological Research Unit on Perinatal Health and Women's and Children Health, Paris-Descartes University, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

³INSERM U1016, CNRS (UMR 8104), Institut Cochin, Paris-Descartes University, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

Abstract

The preterm premature rupture of membranes (PPROM) is a common condition in pregnant women and is associated with significant maternal and perinatal morbidity. Most of the time, the diagnosis is done during physical examination. However, in 10%–20% of equivocal cases, biological markers are needed to confirm the diagnosis, especially when leakage of fluid is low or intermittent. In these cases, a quick and reliable diagnosis is necessary for applying the appropriate measures to reduce perinatal complications. The prognosis in PPRM is linked to maternal inflammatory markers that might predict perinatal infection, and therefore be helpful to decide the timing of the delivery. Nevertheless, further research is needed to identify robust biological markers for the diagnosis of PPRM in equivocal cases and for the prognosis.

Keywords: biological markers; premature rupture of membranes; perinatal morbidity.

Introduction

Premature rupture of membranes (PROM) is defined as the rupture of the amniotic and chorionic membranes with release of the amniotic fluid prior to the onset of labor (with a latency

*Corresponding author: François Goffinet, Maternité de Port-Royal, Groupe Hospitalier Broca-Cochin-Saint Vincent De Paul-Hôtel Dieu, Université Paris Descartes, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, 123 Bd de Port-Royal, 75014 Paris, France
Phone: +33 1 58412069, Fax: +33 1 58412105,
E-mail: francois.goffinet@cch.aphp.fr

Received November 16, 2011; accepted February 28, 2012; previously published online April 14, 2012

duration that ranges from 1 h to 24 h, depending on the studies) and is associated with clinical repercussions, such as preterm delivery and infectious complications (1). PROM may be subdivided into the term PROM (TPROM, i.e., PROM at or after 37 weeks of gestation) and preterm PROM (PPROM, i.e., PROM prior to 37 weeks of gestation) (2). PPRM is a major cause of perinatal morbidity and the integrity of the fetal membranes must be maintained until the end of normal pregnancy to guard the fetus against infection ascending from the genital tract. It is essential to have a definite diagnosis in order to apply the appropriate therapeutic measures to reduce complications. In contrast to the obvious clinical presentations, second-line tests, based on the detection of biological markers, are needed to confirm the diagnosis of PPRM in less clear cases. Multiple mechanisms of disease are likely to be involved in PPRM, but intrauterine inflammation has been recognized as the most frequent cause of spontaneous preterm delivery and PPRM (3, 4). Herein, the prognosis of PPRM is also correlated with gestational tissue's inflammation and infection, which is increased in cases of PPRM. Inflammatory markers are routinely used to try to predict delivery and adverse perinatal outcomes. The aim of this review is to discuss the relevance of biomarkers routinely used in PPRM.

Epidemiology

TPROM occurs in 8% of pregnancies and results in spontaneous labor within 24 h in 60% of cases and within 72 h in 95% of cases (5). Preterm delivery affects 6%–12% of pregnancies. It is a major cause of perinatal mortality and morbidity in early infancy, such as necrotizing enterocolitis, intraventricular hemorrhage, bronchopulmonary dysplasia, and periventricular leukomalacia (PVL) that can lead in the long-term to cerebral palsy. Thirty percent to 40% of preterm deliveries occur after a rupture of membranes (2, 6). However, to date, although intrauterine infection is mostly offended in PPRM, causes of preterm delivery are still misunderstood.

Role of fetal membranes

Located at the maternal-fetal interface, the fetal membranes are often seen as a simple inert shell with the role of

Annexe 4 :

Meta-analysis of studies on biochemical marker tests for the diagnosis of premature rupture of membranes: comparison of performance indexes. Palacio M, Kühnert M, Berger R, Larios CL, **Marcellin L**. BMC Pregnancy Childbirth. 2014

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Meta-analysis of studies on biochemical marker tests for the diagnosis of premature rupture of membranes: comparison of performance indexes

Montse Palacio^{1*}, Maritta Kühnert², Richard Berger³, Cindy L Larios⁴ and Louis Marcellin⁵

Abstract

Background: Premature rupture of the membranes (PROM) is most commonly diagnosed using physical examination; however, accurate decision making in ambiguous cases is a major challenge in current obstetric practice. As this may influence a woman's subsequent management, a number of tests designed to assist with confirming a diagnosis of PROM are commercially available. This study sought to evaluate the published data for the accuracy of two amniotic fluid-specific biomarker tests for PROM: insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1 – Actim[®] PROM) and placental alpha microglobulin-1 (PAMG-1 – AmniSure[®]).

Methods: Main analysis included all PubMed referenced studies related to Actim[®] PROM and AmniSure[®] with available data to extract performance rates. To compare accuracy, a comparison of pooled indexes of both rapid tests was performed. Studies in which both tests were used in the same clinical population were also analysed. Membrane status, whether it was known or a suspected rupture, and inclusion or not of women with bleeding, were considered.

Results: All the available studies published in PubMed up to April 2013 were reviewed. Data were retrieved from 17 studies; 10 for Actim[®] PROM (n = 1066), four for AmniSure[®] (n = 1081) and three studies in which both biomarker tests were compared directly. The pooled analysis found that the specificity and positive predictive value were significantly higher for AmniSure[®] compared with Actim[®] PROM. However, when 762 and 1385 women with known or suspected rupture of membranes, respectively, were evaluated, AmniSure[®] only remained significantly superior in the latter group. Furthermore, when the two tests were compared directly in the same study no statistically significant differences were observed. Remarkably, women with a history or evidence of bleeding were excluded in all four studies for AmniSure[®], in two Actim[®] PROM studies and in two of the three studies reporting on both tests.

Conclusions: No differences were observed in the performance of the two tests in studies where they were used under the same clinical conditions or in women with known membrane status. Although AmniSure[®] performed better in suspected cases of PROM, this may need further analysis as exclusion of bleeding may not be representative of the real clinical presentation of women with suspected PROM.

Keywords: IGFBP-1, PAMG-1, PROM, Rapid test

* Correspondence: mpalacio@clinic.ub.es

¹BCNatal - Barcelona Center for Maternal-Fetal and Neonatal Medicine (Hospital Clínic and Hospital Sant Joan de Deu), IDIBAPS, University of Barcelona and CIBERER Barcelona, Spain, Sabino de Arana 1, Barcelona 08028, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



Annexe 5 :

Trohy2 : marqueurs du remodelage choriodecidual dans les sécretions cervico-vaginales



Recherche de marqueurs de remodelage tissulaire actif, prédictifs d'un accouchement imminent, dans un prélèvement vaginal« **Trophy²** »

PROTOCOLE DE RECHERCHE BIOMEDICALE

Version N°1.3 du 27/02/2015

Code projet : P140502

Investigateur coordonnateur : **Docteur Louis Marcellin**
Service d'Obstétrique et Gynécologie II
Hôpital Cochin Saint Vincent de Paul
123, Bd Port Royal
75679PARIS cedex 14
Courriel : louis.marcellin@cch.aphp.fr

Responsable scientifique : Docteur Céline Méhats
INSERM U1016
Faculté de médecine- Cochin
24 rue du faubourg saint jacques
75014 Paris
Courriel : celine.mehats@inserm.fr

Promoteur : AP-HP et par délégation :
Département de la Recherche Clinique et du développement (DRCD)
Hôpital Saint-Louis
1, avenue Claude Vellefaux
75010 PARIS
Responsable du projet DRCD-Siege: Shohreh AZIMI
Tél : 01 44 84 17 79
Courriel shohreh.azimi@drc.aphp.fr

Structure chargée du suivi de la recherche : Unité de Recherche Clinique (URC) Paris Necker-Cochin
Adresse : Bâtiment Imagine
149 rue de Sèvres
75015 paris
Réfèrent projet URC : Laurence Lecomte
Tél :01 71 19 64 94
Courriel : laurence.lecomte@nck.aphp.fr

Résumé du projet

Titre complet	Recherche de marqueurs de remodelage tissulaire actif, prédictifs d'un accouchement imminent, dans un prélèvement vaginal
Acronyme	Trophy ²
Investigateur coordonnateur	Docteur Louis Marcellin Service d'Obstétrique et Gynécologie II Hôpital Cochin Saint Vincent de Paul 123, Bd Port Royal 75679PARIS cedex 14
Promoteur	Assistance Publique-hôpitaux de paris
Justification scientifique	Trente à cinquante pourcents des femmes en menace d'accouchement prématuré (MAP) accouchent prématurément avant 37 semaines d'aménorrhée (SA). Des biomarqueurs qui permettraient d'identifier les femmes ayant un risque d'accouchement prématuré augmenté pourraient aider à optimiser leur prise en charge en ciblant celles pour qui une hospitalisation, une cure de corticoïdes et un transfert in utéro est justifié. L'équipe "Génomique, Epigénétique et physiopathologies de la Reproduction" Inserm U1016 en partenariat avec les obstétriciens de la maternité Port Royal et le DHU "Risques et Grossesse" a récemment montré qu'à terme, la chorio-décidue en regard du col est le siège d'un remodelage tissulaire actif et que 13 protéines sont spécifiquement secrétées avant l'apparition de signe de travail (contraction utérine et modification du col).
Objectif et critère d'évaluation principal	<u>Objectif principal :</u> Montrer que la présence dans les sécrétions cervico-vaginales de protéines identifiées lors de l'étude in vitro est associée à une augmentation significative du risque d'accouchement dans les 14 jours suivants. <u>Critère d'évaluation principal :</u> Accouchement dans les 14 jours suivant l'inclusion de patientes en MAP, entre 24 ^{0/7} et 32 ^{6/7}
Objectif et critère d'évaluation secondaires	<u>Objectif secondaire :</u> Montrer que la présence dans les sécrétions cervico-vaginales de protéines identifiées lors de l'étude in vitro est associée à une augmentation d'issues obstétricale et/ou néonatale défavorables avant 34 SA. <u>Critère d'évaluation secondaire :</u> Accouchement avant 34 ^{0/7} SA des patientes en MAP entre 24 ^{0/7} et 32 ^{6/7} SA.
Schéma expérimental	La mise en place d'une cohorte prospective monocentrique de femmes en MAP permettra de comparer la présence de protéines préalablement identifiées in vitro dans les sécrétions cervico-vaginales de femmes qui accouchent dans les quatorze jours suivant l'inclusion (groupe cas) à celles qui n'accouchent pas dans ce délai (groupe contrôle). A l'inclusion, un prélèvement des sécrétions cervico-vaginales sera effectué à l'aide d'un écouvillon stérile introduit directement dans le cul de sac vaginal postérieur au cours de l'examen au spéculum. Les protéines seront dosées en aveugle par multiplex en cytométrie de flux.
Population concernée	Femmes présentant une MAP
Critères d'inclusion pour les femmes participant à l'étude préalable	- grossesse unique sans complication - ou -indication d'une césarienne programmée à Port-Royal pour utérus cicatriciel ou bassin limite après 37 SA - ou -première visite consultation de début de grossesse - ou -dernière visite consultation de fin de grossesse
Critère de non inclusion pour les femmes participant à l'étude préalable	- mineures - non affiliées à la sécurité sociale - personnes sous tutelle ou sauvegarde de justice - infection par le VIH, le VHB ou le VHC - diabète ou maladie inflammatoire chronique - porteuse de streptocoques B - grossesse cerclée - fœtus porteur d'anomalies chromosomiques - infections - rupture prématurée des membranes (RPM)
Critères d'inclusion Trophy ²	- Grossesse unique - Hospitalisées pour une MAP entre 24 ^{0/7} et 32 ^{6/7} SA
Critères de non inclusion Trophy ²	- Femmes mineures, - Pas d'affiliation à la sécurité sociale, - Absence de consentement, - Prise de corticoïdes, - Infections VIH, VHB et VHC

Traitement à l'essai	NA
Nombre de sujets	240 (60 patientes dans l'étude préalables et 180 patientes)
Nombre de centre	Recherche monocentrique
Durée de la recherche	Durée d'inclusion : 12 mois Durée de participation maximum : 6 mois Durée totale de l'étude : 24 mois
Nombre d'inclusions prévues/centre/mois	11/mois
Analyse statistique	Pas d'analyse intermédiaire

Annexe 6 :

EndObst : étude prospective multicentrique des conséquence périnatales de l'endométriose

« Conséquences périnatales de l'endométriose : étude prospective comparative multicentrique (projet ENDOBST)

Version N°1-0 du 25/04/15
Code projet : P140304 / N° EUDRACT: 2015-A00262-47

Investigateur coordonnateur : **Dr Louis MARCELLIN**
Hôpital Cochin, Maternité Port Royal
Service Chirurgie Gynécologique
Tél : 01.58.41.37.96
Courriel : louis.marcellin@cch.aphp.fr

Responsable scientifique : **Pr Charles CHAPRON**
Hôpital Cochin, Maternité Port Royal
Service Chirurgie Gynécologique
Tél : 01.58.41.19.33
Courriel : charles.chapron@cch.aphp.fr

Promoteur : **Assistance Publique des Hôpitaux de Paris**
Et par délégation : Département de la
Recherche Clinique et du développement (DRCD)
Carré Historique, Hôpital Saint-Louis
1 avenue Claude Vellefaux, 75010 Paris
Réfèrent projet DRCD-Siege: Shohreh Azimi
Tél : 01 44 84 17 79
Courriel : shohreh.azimi@drc.aphp.fr

Structure chargée
du suivi de la recherche : Unité de Recherche Clinique (URC)
Paris Descartes Necker Cochin
Adresse : 53 boulevard de Port Royal
Réfèrent projet DRCD-URC : Laurence Lecomte
Tél : 01 58 41 35 45
Courriel : laurence.lecomte@cch.aphp.fr

Département de la Recherche Clinique et du Développement (DRCD)
Hôpital Saint Louis 75010 PARIS

RÉSUMÉ SYNOPTIQUE

Titre complet	Conséquences périnatales de l'endométriose : étude prospective comparative multicentrique
Acronyme	ENDOBST
Investigateur coordonnateur	Louis MARCELLIN Hôpital Cochin, Maternité Port Royal Service Chirurgie Gynécologique 53, Av de l'observatoire 75014 Paris
Promoteur	Assistance Publique – Hôpitaux de Paris
Justification scientifique	<p>L'endométriose est une pathologie gynécologique fréquente qui affecterait plus de 10 % des femmes en âge de procréer et qui est retrouvée chez près de 40 % des femmes qui souffrent de douleurs pelviennes chroniques. C'est une maladie inflammatoire chronique, hormono-dépendante, définie par la présence d'endomètre fonctionnel en dehors de la cavité utérine. Les symptômes induits par l'endométriose sont le plus souvent des douleurs et une infertilité qui entravent la qualité de vie des femmes. La maladie peut aussi être asymptomatique. Dans ce cas, elle est découverte de façon fortuite alors que la patiente consulte en raison d'une difficulté à concevoir. Les lésions d'endométriose sont hétérogènes et la maladie se présente sous différents phénotypes qui dépendent de la nature et de la localisation des lésions. Les lésions peuvent être superficielles isolées (implants péritonéaux), ovariennes (kyste endométriosique ovarien = endométriome) ou profondes (nodules invasif de plus de 5 mm). Les lésions profondes peuvent affecter les ligaments utéro-sacrés, la cloison rectovaginale, le rectum, la vessie et les uretères. L'adénomyose est un type d'endométriose interne définie par la présence de glandes endométriales développées à l'intérieur du myomètre</p> <p>Une étude structurée prospective comparative de grande échelle nous semble être la méthode la plus appropriée pour évaluer les risques maternels et fœtaux associés à l'endométriose, et pour préciser le niveau de risque en fonction du phénotype de l'atteinte endométriosique et des antécédents chirurgicaux. Cette étude multicentrique permettra d'évaluer avec une puissance suffisante le risque de prématurité et de pathologie obstétricale associée à l'endométriose en tenant compte du phénotype de l'atteinte endométriosique. Elle permettra d'apporter une information adaptée aux femmes enceintes atteintes d'endométriose, d'orienter le suivi de la grossesse dans les structures adaptées, d'optimiser les stratégies de prise en charge en fonction de la nature des complications et in fine d'améliorer la santé des femmes et de leur enfant à venir</p> <p>Nous faisons l'hypothèse qu'il existe un impact de l'endométriose sur les issues défavorables de la grossesse et que cet impact est vérifié pour tous les phénotypes de l'atteinte endométriosique (superficielle, ovarienne et profonde).</p>
Objectif et critère d'évaluation principal	<p><u>Objectif principal :</u> Rechercher s'il existe un lien entre l'endométriose et l'accouchement prématuré, avant 37 semaines d'aménorrhée (SA), et de vérifier que ce lien est observé pour tous les phénotypes de l'atteinte endométriosique. Nous avons choisi d'étudier la prématurité car c'est une pathologie fréquente, première cause de morbidité de la petite enfance. D'autre part, la physiopathologie de l'accouchement prématuré spontané est liée à des processus inflammatoires de l'interface fœto-maternelle, qui sont également des processus clés, au centre de la physiopathologie de l'endométriose.</p> <p><u>Critère d'évaluation principal :</u> La prématurité définie par un terme d'accouchement supérieur ou égal à 22 SA et inférieur à 37 SA</p>

<p>Objectifs et critères d'évaluation secondaires</p>	<p><u>Objectifs secondaires</u> :</p> <p>Rechercher s'il existe un lien entre l'endométriiose et des issues obstétricales, maternelles et fœtales et néonatales défavorables en tenant compte du phénotype de l'atteinte endométriosique. Plus spécifiquement, nous rechercherons un lien avec la survenue d'une rupture prématurée des membranes, d'une perte fœtale avant 22 SA, d'un retard de croissance intra-utérin, d'une prématurité induite ou spontanée, d'une prééclampsie, d'un placenta praevia, d'une hémorragie de la délivrance. Enfin, nous évaluerons le risque de complication opératoire en cas de césarienne.</p> <p><u>Critères d'évaluation secondaires</u> :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Prématurité spontanée entre 22 SA et 36 SA+6 jours définie par une entrée en travail spontané • Prématurité induite entre 22 SA et 36 SA+6 jours définie par un accouchement après déclenchement ou césarienne avant travail. • Survenue d'une menace d'accouchement prématuré définie par des contractions utérines régulières associées à des modifications cervicales avant 34 SA ayant justifié une hospitalisation pour un traitement tocolytique et une corticothérapie anténatale. • Survenue d'une fausse couche tardive spontanée avant 22 SA. • L'existence d'un retard de croissance intra-utérin définit par l'existence d'un petit poids pour l'âge gestationnel (estimation pondérale in utero inférieur au 10e percentile). • Survenue d'une prééclampsie définie par une hypertension gravidique (Pression artérielle \geq 14/9 à deux reprises) associée à une protéinurie supérieure à 0,3g/24heures. • Diagnostic d'un placenta bas inséré à moins de 50 mm de l'orifice interne du col ou recouvrant à l'échographie du troisième trimestre. • Survenue d'une hémorragie du post partum immédiat définie par des pertes sanguines estimées à plus de 500 ml dans les 24 premières heures de l'accouchement. • Suture de vessie pour une plaie vésicale en cours de césarienne authentifiée par une épreuve au bleu vésical. • Evaluation des adhérences abdomino-pelviennes en cas de césarienne à l'aide d'un questionnaire spécifique, par : <ul style="list-style-type: none"> ○ un score d'adhérence calculé en tenant compte de l'aspect pour chaque site selon le questionnaire suivant qui aura été inséré dans le dossier. <ul style="list-style-type: none"> ▪ entre l'utérus et la paroi abdominale ▪ entre l'utérus et la vessie, ▪ entre le tube digestif et l'utérus ▪ Annexe visualisable ou pas uni ou bilatérale ○ le délai d'incision cutanée / naissance ○ la durée totale de la césarienne
<p>Schéma expérimental</p>	<p>Etude prospective multicentrique comparative de type exposé – non exposé. Elle comparera l'issue de la grossesse du groupe exposé pris dans son ensemble (toutes les femmes avec endométriiose), ainsi que chacun des trois groupes de femmes définis par le phénotype de l'atteinte endométriosique (superficielle, ovarienne, profonde), à celle d'un groupe de femmes non exposées, indemnes d'endométriiose.</p> <p>Le caractère prospectif de l'étude permettra de garantir la qualité des informations recueillies aussi bien sur les critères diagnostiques de l'endométriiose que sur les issues de la grossesse et l'ensemble des facteurs qu'il faudra prendre en compte dans l'analyse. Enfin, le caractère multicentrique de l'étude garantit la faisabilité et la validité externe du projet.</p>
<p>Population concernée</p>	<p>Femmes enceintes</p>
<p>Critères d'inclusion</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Patiente majeure • Grossesse unique • Patiente suivie avant 22 SA et accouchant dans la maternité participant

	<p>à l'étude</p> <ul style="list-style-type: none"> • Affiliées à la Sécurité sociale ou à défaut, à un autre système d'assurance maladie
Critères de non inclusion	<ul style="list-style-type: none"> • Opposition à l'utilisation de leurs données médicales personnelles ou des données médicales de leur enfant à des fins de recherche • Femmes enceintes de grossesses multiples • Femmes séropositives pour le VIH • Patientes adressées dans le centre dans le cadre d'un transfert in utero. • Femmes dont la grossesse se complique d'une fausse couche spontanée avant 15 SA
Autres actes ajoutés par la recherche	Prises de sang en salle de naissance et prélèvement salivaire
Risques ajoutés par la recherche	
Déroulement pratique	<p>Le recrutement des femmes fera appel aux consultants, à l'investigateur local et au TEC.</p> <p>Inclusion dans le groupe exposé</p> <p>Une pré-inclusion réalisée à l'aide d'un screening simple précédera l'inclusion définitive des femmes dans l'étude. Les modalités ont été établies grâce à l'expérience du CIC mère-enfant dans ce type d'étude et aux enseignements tirés de l'étude pilote du premier semestre 2014. Un formulaire d'inclusion et de suivi sera disponible (Annexe 2). Il contient une information dédiée pour l'étude, et est subdivisé en 4 sections :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Section n°1 : un questionnaire simplifié qui vise à identifier les femmes ayant un antécédent d'endométriose des autres. - Section n°2 : un questionnaire détaillé dont le but est de permettre l'inclusion des femmes dans le groupe endométriose ou dans le groupe témoin. - Section n°3 : un module spécifique réservé à l'investigateur local pour valider définitivement l'inclusion. - Section n°4 : un questionnaire d'évaluation pendant la césarienne destiné à l'obstétricien en cas de césarienne. <p>Les femmes consultant pour la première fois à la maternité avant 28 SA seront informées et sollicitées pour participer à l'étude. Il n'y aura pas de consentement écrit signé demandé, l'étude étant observationnelle, mais une non opposition sera demandée aux patientes. Le formulaire d'inclusion et de suivi sera remis à la patiente. En cas de notion d'endométriose identifiée par le questionnaire simplifié du formulaire d'inclusion et de suivi (section 1), et en cas de non opposition de la femme, le consultant débute la pré-inclusion. Il complète avec la patiente le questionnaire détaillé (section n°2) en colligeant, s'ils sont disponibles, les documents nécessaires à l'inclusion (compte rendu opératoire, histologique et radiologique). Si ces documents ne sont pas disponibles, il remet à la patiente la liste des documents requis pour l'inclusion définitive et pour déterminer son phénotype.</p> <p>Le consultant met le formulaire d'inclusion et de suivi dans un endroit dédié à l'accueil des consultations de la maternité. L'investigateur local ou le TEC sont ainsi prévenus et peuvent réaliser la pré-inclusion informatique grâce au logiciel Cleanweb. Si la femme n'a pas les documents nécessaires en sa possession, l'investigateur local, avec l'aide du TEC, écrira aux différents correspondants pour compléter les informations nécessaires (courriers aux chirurgiens, recueil des comptes rendus opératoires, histologiques et d'imagerie) grâce à un courrier type préétablis (Annexe n°3).</p> <p>Au décours de cette pré-inclusion, le TEC devra récupérer pour la consultation suivante les éléments nécessaires (compte rendu opératoire, histologique et radiologique) et informera l'investigateur local pour réaliser l'inclusion définitive ainsi que le classement dans les sous groupe de l'étude</p>

	<p>en fonction de l'un des 3 phénotypes (section n°3). Le formulaire d'inclusion et de suivi est alors remis dans le dossier médical et une marque de la participation à l'étude sera apposée sur le dossier médical matérialisé par une étiquette.</p> <p>Inclusion dans le groupe non exposé</p> <p>Après l'inclusion dans le groupe exposé d'une femme endométriosique, l'inclusion de deux femmes non atteintes dans le groupe non exposé sera réalisée. L'organisation du recrutement des femmes non exposées sera propre à chaque centre et sous la responsabilité de l'investigateur local. Les femmes consultant avant 22 SA pour leur première consultation dans la maternité seront sollicité pour participer à l'étude. Celles qui n'auront pas d'antécédent d'endométriose identifié par le questionnaire simplifié (section n°1) du formulaire d'inclusion et de suivi pourront être incluse dans l'étude. Le recrutement sera simple car il s'agit pour la femme de répondre à 3 questions du questionnaire détaillé (section n°2) et de ne pas exprimer une opposition à l'utilisation des données de sa grossesse. Toutes les autres procédures et recueil de données seront réalisés par le TEC.</p> <p>Prélèvements biologiques</p> <p>Les femmes incluses dans l'étude ENDOBST seront sollicitées pour participer à une étude ancillaire, intitulée ENDOBST-bio, dont une recherche de financement est en cours. Cette étude fondamentale a partir d'échantillons biologiques a pour but d'étudier s'il existe des mécanismes dérégulés à l'interface materno-fœtale des femmes atteintes d'endométriose.</p> <p>Pour femmes qui auront donnée leur consentement et dans les centres disposant d'un CIC (Port Royal, Poissy et Jeanne de Flandre) :</p> <ul style="list-style-type: none"> - un prélèvement buccal anonymisé sera pratiqué en vue de la réalisation d'une étude d'association pangénomique qui permettra l'analyse des nombreuses variations génétiques et leurs corrélations avec des traits phénotypiques et notamment la survenue de complications de la grossesse. - A l'entrée en salle de naissance, un prélèvement sanguin sera réalisé dans un but de conservation de sérum en vue de dosages de marqueurs immunomodulateurs solubles / anti- et pro-inflammatoires de l'interface materno-fœtale. Pour femmes qui auront donnée leur consentement dans le centre de Port Royal uniquement de échantillons de placenta, de membranes fœtales et de sang de cordon seront prélevés à l'accouchement.
Nombre de sujets sélectionnés	1800
Nombre de centres	8 maternités
Durée de la recherche	<ul style="list-style-type: none"> - durée d'inclusion : 18 mois - durée de participation (traitement + suivi) : 49 semaines maximum - durée totale : 29 mois
Nombre d'inclusions prévues par centre et par mois	15 (5 cas et 10 témoins) par centre et par mois
Analyse statistique	Il n'est pas prévu d'analyse intermédiaire
Source de financement	Ministère de la Santé (PHRC)
Comité de Surveillance Indépendant prévu	Non

Références

1. Liggins, G.C., et al., *Control of parturition in man*. Biol Reprod, 1977. **16**(1): p. 39-56.
2. Norwitz, E.R., J.N. Robinson, and J.R. Challis, *The control of labor*. N Engl J Med, 1999. **341**(9): p. 660-6.
3. Mercer, B.M., *Preterm premature rupture of the membranes*. Obstet Gynecol, 2003. **101**(1): p. 178-93.
4. Ancel, P.Y., [*Epidemiology of premature rupture of the membranes. Risk factors and consequences in terms of health: maternal morbidity and mortality, neonatal and early childhood*]. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris), 1999. **28**(7): p. 607-25.
5. Kamina, P., *anatomie gynécologique et obstétricale*. 4ième édition ed, ed. M.s.a. éditeur. 1984, Paris.
6. Noyes, R.W., A.T. Hertig, and J. Rock, *Dating the endometrial biopsy*. Am J Obstet Gynecol, 1975. **122**(2): p. 262-3.
7. Gargett, C.E., H.P. Nguyen, and L. Ye, *Endometrial regeneration and endometrial stem/progenitor cells*. Rev Endocr Metab Disord, 2012. **13**(4): p. 235-51.
8. Prianishnikov, V.A., *On the concept of stem cell and a model of functional-morphological structure of the endometrium*. Contraception, 1978. **18**(3): p. 213-23.
9. Tanaka, M., et al., *Evidence of the monoclonal composition of human endometrial epithelial glands and mosaic pattern of clonal distribution in luminal epithelium*. Am J Pathol, 2003. **163**(1): p. 295-301.
10. Padykula, H.A., et al., *The basalis of the primate endometrium: a bifunctional germinal compartment*. Biol Reprod, 1989. **40**(3): p. 681-90.
11. Taylor, H.S., *Endometrial cells derived from donor stem cells in bone marrow transplant recipients*. JAMA, 2004. **292**(1): p. 81-5.
12. Chan, R.W., K.E. Schwab, and C.E. Gargett, *Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells*. Biol Reprod, 2004. **70**(6): p. 1738-50.
13. Gargett, C.E., et al., *Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium*. Biol Reprod, 2009. **80**(6): p. 1136-45.
14. Gargett, C.E. and L. Ye, *Endometrial reconstruction from stem cells*. Fertil Steril, 2012. **98**(1): p. 11-20.
15. Macias, M.I., et al., *Isolation and characterization of true mesenchymal stem cells derived from human term decidua capable of multilineage differentiation into all 3 embryonic layers*. Am J Obstet Gynecol, 2010. **203**(5): p. 495 e9-495 e23.
16. Brennand, K., D. Huangfu, and D. Melton, *All beta cells contribute equally to islet growth and maintenance*. PLoS Biol, 2007. **5**(7): p. e163.
17. Humphreys, B.D., et al., *Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury*. Cell Stem Cell, 2008. **2**(3): p. 284-91.
18. Gargett, C.E., et al., *Potential role of endometrial stem/progenitor cells in the pathogenesis of early-onset endometriosis*. Mol Hum Reprod, 2014. **20**(7): p. 591-8.
19. King, A., *Uterine leukocytes and decidualization*. Hum Reprod Update, 2000. **6**(1): p. 28-36.
20. Moffett-King, A., *Natural killer cells and pregnancy*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(9): p. 656-63.
21. Gellersen, B. and J.J. Brosens, *Cyclic Decidualization of the Human Endometrium in Reproductive Health and Failure*. Endocr Rev, 2014: p. er20141045.

22. Aplin, J.D., et al., *Growth factor-extracellular matrix synergy in the control of trophoblast invasion*. Biochem Soc Trans, 2000. **28**(2): p. 199-202.
23. Brosens, J.J., et al., *A role for menstruation in preconditioning the uterus for successful pregnancy*. Am J Obstet Gynecol, 2009. **200**(6): p. 615 e1-6.
24. Lawn, A.M., E.W. Wilson, and C.A. Finn, *The ultrastructure of human decidual and predecidual cells*. J Reprod Fertil, 1971. **26**(1): p. 85-90.
25. Iwahashi, M., et al., *Alterations in distribution and composition of the extracellular matrix during decidualization of the human endometrium*. J Reprod Fertil, 1996. **108**(1): p. 147-55.
26. Wewer, U.M., et al., *Immunochemical and ultrastructural assessment of the nature of the pericellular basement membrane of human decidual cells*. Lab Invest, 1985. **53**(6): p. 624-33.
27. Sunder, S. and E.A. Lenton, *Endocrinology of the peri-implantation period*. Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2000. **14**(5): p. 789-800.
28. Bentin-Ley, U., *Relevance of endometrial pinopodes for human blastocyst implantation*. Hum Reprod, 2000. **15 Suppl 6**: p. 67-73.
29. Chen, G.T., S. Getsios, and C.D. MacCalman, *Cadherin-11 is a hormonally regulated cellular marker of decidualization in human endometrial stromal cells*. Mol Reprod Dev, 1999. **52**(2): p. 158-65.
30. Johansson, E.D. and L. Wide, *Periovulatory levels of plasma progesterone and luteinizing hormone in women*. Acta Endocrinol (Copenh), 1969. **62**(1): p. 82-8.
31. Tang, B. and E. Gurpide, *Direct effect of gonadotropins on decidualization of human endometrial stroma cells*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1993. **47**(1-6): p. 115-21.
32. Kasahara, K., et al., *The role of human chorionic gonadotropin on decidualization of endometrial stromal cells in vitro*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(3): p. 1281-6.
33. Bartscha, O. and R. Ivell, *Relaxin and phosphodiesterases collaborate during decidualization*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1030**: p. 479-92.
34. Makrigiannakis, A., et al., *The decidualizing effect of progesterone may involve direct transcriptional activation of corticotrophin-releasing hormone from human endometrial stromal cells*. Mol Hum Reprod, 1999. **5**(9): p. 789-96.
35. Milne, S.A., et al., *Expression, localization, and signaling of PGE(2) and EP2/EP4 receptors in human nonpregnant endometrium across the menstrual cycle*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(9): p. 4453-9.
36. Christian, M., et al., *Interferon-gamma modulates prolactin and tissue factor expression in differentiating human endometrial stromal cells*. Endocrinology, 2001. **142**(7): p. 3142-51.
37. Dimitriadis, E., et al., *Relaxin and prostaglandin E(2) regulate interleukin 11 during human endometrial stromal cell decidualization*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(6): p. 3458-65.
38. Tamura, M., et al., *Interleukin-1beta elevates cyclooxygenase-2 protein level and enzyme activity via increasing its mRNA stability in human endometrial stromal cells: an effect mediated by extracellularly regulated kinases 1 and 2*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(7): p. 3263-73.
39. Fazleabas, A.T., J.J. Kim, and Z. Strakova, *Implantation: embryonic signals and the modulation of the uterine environment--a review*. Placenta, 2004. **25 Suppl A**: p. S26-31.
40. Mulayim, N., et al., *Chemokine receptor expression in human endometrium*. Biol Reprod, 2003. **68**(5): p. 1491-5.
41. Baston-Bust, D.M., et al., *CXCL1 expression in human decidua in vitro is mediated via the MAPK signalling cascade*. Cytokine, 2013. **64**(1): p. 79-85.

42. Gubbay, O., et al., *Prolactin induces ERK phosphorylation in epithelial and CD56(+) natural killer cells of the human endometrium*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(5): p. 2329-35.
43. Dunn, C.L., H.O. Critchley, and R.W. Kelly, *IL-15 regulation in human endometrial stromal cells*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(4): p. 1898-901.
44. Jones, R.L., L.A. Salamonsen, and J.K. Findlay, *Potential roles for endometrial inhibins, activins and follistatin during human embryo implantation and early pregnancy*. Trends Endocrinol Metab, 2002. **13**(4): p. 144-50.
45. Winterhager, E. and A. Gellhaus, *The role of the CCN family of proteins in female reproduction*. Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(12): p. 2299-311.
46. Moghadam, K.K., et al., *Cannabinoid receptor 1 activation markedly inhibits human decidualization*. Mol Cell Endocrinol, 2005. **229**(1-2): p. 65-74.
47. Evain-Brion, D. and A. Malassiné, *Le placenta humain*. 2010.
48. Mehats, C., et al., *[Biochemistry of fetal membranes rupture]*. Gynecol Obstet Fertil, 2011. **39**(6): p. 365-9.
49. Bryant-Greenwood, G.D., *The extracellular matrix of the human fetal membranes: structure and function*. Placenta, 1998. **19**(1): p. 1-11.
50. Bourne, G.L., *The microscopic anatomy of the human amnion and chorion*. Am J Obstet Gynecol, 1960. **79**: p. 1070-3.
51. Oyen, M.L., S.E. Calvin, and D.V. Landers, *Premature rupture of the fetal membranes: is the amnion the major determinant?* Am J Obstet Gynecol, 2006. **195**(2): p. 510-5.
52. Schmidt, W., *The amniotic fluid compartment: the fetal habitat*. Adv Anat Embryol Cell Biol, 1992. **127**: p. 1-100.
53. Vercellini, P., et al., *Endometriosis and pelvic pain: relation to disease stage and localization*. Fertil Steril, 1996. **65**(2): p. 299-304.
54. *Prevalence and anatomical distribution of endometriosis in women with selected gynaecological conditions: results from a multicentric Italian study*. Gruppo italiano per lo studio dell'endometriosi. Hum Reprod, 1994. **9**(6): p. 1158-62.
55. Fauconnier, A. and C. Chapron, *Endometriosis and pelvic pain: epidemiological evidence of the relationship and implications*. Hum Reprod Update, 2005. **11**(6): p. 595-606.
56. Vercellini, P., et al., *Endometriosis: pathogenesis and treatment*. Nat Rev Endocrinol, 2014. **10**(5): p. 261-75.
57. Chapron, C., et al., *Deeply infiltrating endometriosis: pathogenetic implications of the anatomical distribution*. Hum Reprod, 2006. **21**(7): p. 1839-45.
58. Benagiano, G., I. Brosens, and M. Habiba, *Structural and molecular features of the endomyometrium in endometriosis and adenomyosis*. Hum Reprod Update, 2014. **20**(3): p. 386-402.
59. Bulun, S.E., *Endometriosis*. N Engl J Med, 2009. **360**(3): p. 268-79.
60. de Ziegler, D., B. Borghese, and C. Chapron, *Endometriosis and infertility: pathophysiology and management*. Lancet, 2010. **376**(9742): p. 730-8.
61. Kennedy, S., et al., *ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis*. Hum Reprod, 2005. **20**(10): p. 2698-704.
62. Streuli, I., et al., *An update on the pharmacological management of endometriosis*. Expert Opin Pharmacother, 2013. **14**(3): p. 291-305.
63. Vercellini, P., et al., *Endometriosis: current therapies and new pharmacological developments*. Drugs, 2009. **69**(6): p. 649-75.
64. Vercellini, P., et al., *'Waiting for Godot': a commonsense approach to the medical treatment of endometriosis*. Hum Reprod, 2011. **26**(1): p. 3-13.

65. Dousset, B., et al., *Complete surgery for low rectal endometriosis: long-term results of a 100-case prospective study*. Ann Surg, 2010. **251**(5): p. 887-95.
66. Meuleman, C., et al., *Surgical treatment of deeply infiltrating endometriosis with colorectal involvement*. Hum Reprod Update, 2011. **17**(3): p. 311-26.
67. Jacobson, T.Z., et al., *Laparoscopic surgery for pelvic pain associated with endometriosis*. Cochrane Database Syst Rev, 2009(4): p. CD001300.
68. Jacobson, T.Z., et al., *Laparoscopic surgery for subfertility associated with endometriosis*. Cochrane Database Syst Rev, 2010(1): p. CD001398.
69. Borghese, B., et al., *[Recurrence of pain after surgery for deeply infiltrating endometriosis: How does it happen? How to manage?]*. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris), 2012.
70. Garry, R., R. Clayton, and J. Hawe, *The effect of endometriosis and its radical laparoscopic excision on quality of life indicators*. BJOG, 2000. **107**(1): p. 44-54.
71. Guo, S.W., *Recurrence of endometriosis and its control*. Hum Reprod Update, 2009. **15**(4): p. 441-61.
72. Vercellini, P., et al., *The effect of surgery for symptomatic endometriosis: the other side of the story*. Hum Reprod Update, 2009. **15**(2): p. 177-88.
73. Olikier, A.J. and A.E. Harris, *Endometriosis of the bladder in a male patient*. J Urol, 1971. **106**(6): p. 858-9.
74. Schrodt, G.R., M.O. Alcorn, and J. Ibanez, *Endometriosis of the male urinary system: a case report*. J Urol, 1980. **124**(5): p. 722-3.
75. Martin, J.D., Jr. and A.E. Hauck, *Endometriosis in the male*. Am Surg, 1985. **51**(7): p. 426-30.
76. Beckman, E.N., et al., *Endometriosis of the prostate*. Am J Surg Pathol, 1985. **9**(5): p. 374-9.
77. El-Mahgoub, S. and S. Yaseen, *A positive proof for the theory of coelomic metaplasia*. Am J Obstet Gynecol, 1980. **137**(1): p. 137-40.
78. Rosenfeld, D.L. and B.D. Lecher, *Endometriosis in a patient with Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome*. Am J Obstet Gynecol, 1981. **139**(1): p. 105.
79. Peress, M.R., et al., *Pelvic endometriosis and Turner's syndrome*. Am J Obstet Gynecol, 1982. **144**(4): p. 474-6.
80. Binns, B.A. and R. Banerjee, *Endometriosis with Turner's syndrome treated with cyclical oestrogen/progestogen. Case report*. Br J Obstet Gynaecol, 1983. **90**(6): p. 581-2.
81. Doty, D.W., et al., *46,XY pure gonadal dysgenesis: report of 2 unusual cases*. Obstet Gynecol, 1980. **55**(3 Suppl): p. 61S-65S.
82. Ferrari, S., et al., *An ovarian endometriotic cyst in a patient with prepubertal hypopituitarism due to a craniopharyngioma: a clue for endometrioma pathogenesis*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2012. **164**(1): p. 115-6.
83. Levander, G. and P. Normann, *The pathogenesis of endometriosis; an experimental study*. Acta Obstet Gynecol Scand, 1955. **34**(4): p. 366-98.
84. Merrill, J.A., *Endometrial induction of endometriosis across Millipore filters*. Am J Obstet Gynecol, 1966. **94**(6): p. 780-90.
85. Javert, C.T., *Observations on the pathology and spread of endometriosis based on the theory of benign metastasis*. Am J Obstet Gynecol, 1951. **62**(3): p. 477-87.
86. Javert, C.T., *The spread of benign and malignant endometrium in the lymphatic system with a note on coexisting vascular involvement*. Am J Obstet Gynecol, 1952. **64**(4): p. 780-806.
87. Brougher, J.C., Am J Obstet Gynecol, 1947. **54**: p. 127.

88. Sampson, J.A., *Heterotopic or misplaced endometrial tissue*. Am J Obstet Gynecol, 1925. **10**: p. 649-664.
89. Shaw, W.F., Am J Obstet Gynecol, 1925. **32**: p. 121.
90. Javert, C.T., Cancer, 1949. **2**: p. 399.
91. Taussig, F.J., Am J Obstet Gynecol, 1934. **28**: p. 650.
92. Sampson, J.A., *Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity*. Am. J. Obstet. Gynecol., 1927. **14**: p. 422-469.
93. Du, H. and H.S. Taylor, *Contribution of bone marrow-derived stem cells to endometrium and endometriosis*. Stem Cells, 2007. **25**(8): p. 2082-6.
94. Maruyama, T. and Y. Yoshimura, *Stem cell theory for the pathogenesis of endometriosis*. Front Biosci (Elite Ed), 2012. **4**: p. 2854-63.
95. Sasson, I.E. and H.S. Taylor, *Stem cells and the pathogenesis of endometriosis*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1127**: p. 106-15.
96. Brosens, I.A. and J.J. Brosens, *Redefining endometriosis: is deep endometriosis a progressive disease?* Hum Reprod, 2000. **15**(1): p. 1-3.
97. Tosti, C., et al., *Pathogenetic Mechanisms of Deep Infiltrating Endometriosis*. Reprod Sci, 2015.
98. Bulun, S.E., et al., *Progesterone resistance in endometriosis: link to failure to metabolize estradiol*. Mol Cell Endocrinol, 2006. **248**(1-2): p. 94-103.
99. Santulli, P., et al., *Hormonal Therapy Deregulates Prostaglandin-Endoperoxidase Synthase 2 (PTGS2) Expression in Endometriotic Tissues*. J Clin Endocrinol Metab, 2014. **99**(3): p. 881-90.
100. Santulli, P., et al., *Sphingosine pathway deregulation in endometriotic tissues*. Fertil Steril, 2012. **97**(4): p. 904-11.
101. Santulli, P., et al., *Protein oxidative stress markers in peritoneal fluids of women with deep infiltrating endometriosis are increased*. Hum Reprod, 2015. **30**(1): p. 49-60.
102. Beecham, C.T., *Surgical treatment of endometriosis with special reference to conservative surgery in young women*. J Am Med Assoc, 1949. **139**(15): p. 971.
103. McArthur, J.W. and H. Ulfelder, *The effect of pregnancy upon endometriosis*. Obstet Gynecol Surv, 1965. **20**(5): p. 709-33.
104. Schenken, R.S., R.F. Williams, and G.D. Hodgen, *Effect of pregnancy on surgically induced endometriosis in cynomolgus monkeys*. Am J Obstet Gynecol, 1987. **157**(6): p. 1392-6.
105. Coccia, M.E., et al., *The effect of the hormonal milieu of pregnancy on deep infiltrating endometriosis: serial ultrasound assessment of changes in size and pattern of deep endometriotic lesions*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2012. **160**(1): p. 35-9.
106. Moen, M.H. and K.M. Muus, *Endometriosis in pregnant and non-pregnant women at tubal sterilization*. Hum Reprod, 1991. **6**(5): p. 699-702.
107. Ueda, Y., et al., *A retrospective analysis of ovarian endometriosis during pregnancy*. Fertil Steril, 2010. **94**(1): p. 78-84.
108. Wu, C.Y., et al., *Spontaneous hemoperitoneum in pregnancy from a ruptured superficial uterine vessel*. Taiwan J Obstet Gynecol, 2007. **46**(1): p. 77-80.
109. Tourette, C., et al., *[An unexpected aetiology of massive haemoperitoneum during pregnancy]*. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris), 2011. **40**(1): p. 81-4.
110. Roche, M., et al., *Spontaneous hemoperitoneum in a twin pregnancy complicated by endometriosis*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2008. **21**(12): p. 924-6.

111. Passos, F., C. Calhaz-Jorge, and L.M. Graca, *Endometriosis is a possible risk factor for spontaneous hemoperitoneum in the third trimester of pregnancy*. Fertil Steril, 2008. **89**(1): p. 251-2.
112. Mizumoto, Y., et al., *Spontaneous rupture of the uterine vessels in a pregnancy complicated by endometriosis*. Acta Obstet Gynecol Scand, 1996. **75**(9): p. 860-2.
113. Leung, W.C., T.W. Leung, and Y.H. Lam, *Haemoperitoneum due to cornual endometriosis during pregnancy resulting in intrauterine death*. Aust N Z J Obstet Gynaecol, 1998. **38**(2): p. 156-7.
114. Lajtman, E., et al., [*Spontaneous rupture of uterine vessels during pregnancy in a patient with previous endometriosis*]. Ceska Gynekol, 2011. **76**(2): p. 161-3.
115. Katorza, E., et al., *Severe intraabdominal bleeding caused by endometriotic lesions during the third trimester of pregnancy*. Am J Obstet Gynecol, 2007. **197**(5): p. 501 e1-4.
116. Ismail, K.M. and J. Shervington, *Hemoperitoneum secondary to pelvic endometriosis in pregnancy*. Int J Gynaecol Obstet, 1999. **67**(2): p. 107-8.
117. Gonzalez Rosales, R., et al., [*Uterine vessels spontaneous rupture during pregnancy: case report and literature review*]. Ginecol Obstet Mex, 2008. **76**(4): p. 221-3.
118. Brosens, I.A., L. Fusi, and J.J. Brosens, *Endometriosis is a risk factor for spontaneous hemoperitoneum during pregnancy*. Fertil Steril, 2009. **92**(4): p. 1243-5.
119. Brosens, I., et al., *Risks of adverse pregnancy outcome in endometriosis*. Fertil Steril, 2012. **98**(1): p. 30-5.
120. Aziz, U., et al., *Spontaneous rupture of the uterine vessels in pregnancy*. Obstet Gynecol, 2004. **103**(5 Pt 2): p. 1089-91.
121. Chiodo, I., et al., *Urohemoperitoneum during pregnancy with consequent fetal death in a patient with deep endometriosis*. J Minim Invasive Gynecol, 2008. **15**(2): p. 202-4.
122. Clement, P.B., *Perforation of the sigmoid colon during pregnancy: a rare complication of endometriosis. Case report*. Br J Obstet Gynaecol, 1977. **84**(7): p. 548-50.
123. Rud, B., [*Colonic endometriosis with perforation during pregnancy*]. Ugeskr Laeger, 1979. **141**(41): p. 2831-2.
124. Gini, P.C., W.O. Chukudebelu, and W.I. Onuigbo, *Perforation of the appendix during pregnancy: a rare complication of endometriosis. Case report*. Br J Obstet Gynaecol, 1981. **88**(4): p. 456-8.
125. Nakatani, Y., et al., *Appendiceal endometriosis in pregnancy. Report of a case with perforation and review of the literature*. Acta Pathol Jpn, 1987. **37**(10): p. 1685-90.
126. Schweitzer, K.J., E. van Bekkum, and C.J. de Groot, *Endometriosis with intestinal perforation in term pregnancy*. Int J Gynaecol Obstet, 2006. **93**(2): p. 152-3.
127. Faucheron, J.L., D. Pasquier, and D. Voirin, *Endometriosis of the vermiform appendix as an exceptional cause of acute perforated appendicitis during pregnancy*. Colorectal Dis, 2008. **10**(5): p. 518-9.
128. Pisanu, A., et al., *Rectal perforation from endometriosis in pregnancy: case report and literature review*. World J Gastroenterol, 2010. **16**(5): p. 648-51.
129. Boileau, L., et al., *Pelvipерitonitis by colorectal perforation in the third trimester of pregnancy after surgery for deep pelvic endometriosis*. Fertil Steril, 2011. **96**(1): p. e42-4.
130. Nishikawa, A., et al., *Ileal perforation and massive intestinal haemorrhage from endometriosis in pregnancy: case report and literature review*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2013. **170**(1): p. 20-4.

131. Costa, A., et al., *Deep endometriosis induced spontaneous colon rectal perforation in pregnancy: laparoscopy is advanced tool to confirm diagnosis*. Case Rep Obstet Gynecol, 2014. **2014**: p. 907150.
132. Floberg, J., et al., *Postpartum perforation of the colon due to endometriosis*. Acta Obstet Gynecol Scand, 1984. **63**(2): p. 183-4.
133. Beamish, R.E., R. Aslam, and J.M. Gilbert, *Postpartum caecal perforation due to endometriosis*. JRSM Short Rep, 2010. **1**(7): p. 61.
134. Bergamini, A., et al., *Endometriosis-associated tumor at the inguinal site: report of a case diagnosed during pregnancy and literature review*. J Obstet Gynaecol Res, 2014. **40**(4): p. 1132-6.
135. Mascilini, F., et al., *Imaging in gynecological disease. 10: Clinical and ultrasound characteristics of decidualized endometriomas surgically removed during pregnancy*. Ultrasound Obstet Gynecol, 2014. **44**(3): p. 354-60.
136. Canlorbe, G., et al., *[Ectopic decidua: variability of presentation in pregnancy and differential diagnoses]*. Gynecol Obstet Fertil, 2012. **40**(4): p. 235-40.
137. Buttner, A., R. Bassler, and C. Theele, *Pregnancy-associated ectopic decidua (deciduosis) of the greater omentum. An analysis of 60 biopsies with cases of fibrosing deciduosis and leiomyomatosis peritonealis disseminata*. Pathol Res Pract, 1993. **189**(3): p. 352-9.
138. Petraglia, F., et al., *Inflammation: a link between endometriosis and preterm birth*. Fertil Steril, 2012. **98**(1): p. 36-40.
139. Vercellini, P., et al., *Pregnancy outcome in women with peritoneal, ovarian and rectovaginal endometriosis: a retrospective cohort study*. Bjog, 2012. **119**(12): p. 1538-43.
140. Stephansson, O., et al., *Endometriosis, assisted reproduction technology, and risk of adverse pregnancy outcome*. Hum Reprod, 2009. **24**(9): p. 2341-7.
141. Carassou-Maillan, A., et al., *[Adverse pregnancy outcomes after Assisted Reproduction Technology in women with endometriosis]*. Gynecol Obstet Fertil, 2014. **42**(4): p. 210-5.
142. Mekar, K., et al., *Endometriosis and pregnancy outcome: are pregnancies complicated by endometriosis a high-risk group?* Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2014. **172**: p. 36-9.
143. Falconer, H., *Pregnancy outcomes in women with endometriosis*. Semin Reprod Med, 2013. **31**(2): p. 178-82.
144. Kortelahti, M., et al., *Obstetric outcome in women with endometriosis--a matched case-control study*. Gynecol Obstet Invest, 2003. **56**(4): p. 207-12.
145. Fowler, P.A., et al., *An investigation of the effects of endometriosis on the proteome of human eutopic endometrium: a heterogeneous tissue with a complex disease*. Proteomics, 2007. **7**(1): p. 130-42.
146. Brosens, I., et al., *The enigmatic uterine junctional zone: the missing link between reproductive disorders and major obstetrical disorders?* Hum Reprod, 2010. **25**(3): p. 569-74.
147. Afshar, Y., et al., *Changes in eutopic endometrial gene expression during the progression of experimental endometriosis in the baboon, Papio anubis*. Biol Reprod, 2013. **88**(2): p. 44.
148. Brosens, I., G. Kunz, and G. Benagiano, *Is adenomyosis the neglected phenotype of an endomyometrial dysfunction syndrome?* Gynecol Surg, 2012. **9**(2): p. 131-137.
149. Mettler, L., et al., *Comparison of c-DNA microarray analysis of gene expression between eutopic endometrium and ectopic endometrium (endometriosis)*. J Assist Reprod Genet, 2007. **24**(6): p. 249-58.

150. Taylor, R.N., S.G. Lundeen, and L.C. Giudice, *Emerging role of genomics in endometriosis research*. *Fertil Steril*, 2002. **78**(4): p. 694-8.
151. Kao, L.C., et al., *Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate genes for disease-based implantation failure and infertility*. *Endocrinology*, 2003. **144**(7): p. 2870-81.
152. Taylor, H.S., et al., *HOX gene expression is altered in the endometrium of women with endometriosis*. *Hum Reprod*, 1999. **14**(5): p. 1328-31.
153. Ramathal, C.Y., et al., *Endometrial decidualization: of mice and men*. *Semin Reprod Med*, 2010. **28**(1): p. 17-26.
154. Burney, R.O., et al., *Gene expression analysis of endometrium reveals progesterone resistance and candidate susceptibility genes in women with endometriosis*. *Endocrinology*, 2007. **148**(8): p. 3814-26.
155. Attia, G.R., et al., *Progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000. **85**(8): p. 2897-902.
156. Zeitoun, K., et al., *Deficient 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in endometriosis: failure to metabolize 17beta-estradiol*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998. **83**(12): p. 4474-80.
157. Kim, J.J. and A.T. Fazleabas, *Uterine receptivity and implantation: the regulation and action of insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1), HOXA10 and forkhead transcription factor-1 (FOXO-1) in the baboon endometrium*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2004. **2**: p. 34.
158. Grimaldi, G., et al., *Down-regulation of the histone methyltransferase EZH2 contributes to the epigenetic programming of decidualizing human endometrial stromal cells*. *Mol Endocrinol*, 2011. **25**(11): p. 1892-903.
159. Munro, S.K., et al., *Epigenetic regulation of endometrium during the menstrual cycle*. *Mol Hum Reprod*, 2010. **16**(5): p. 297-310.
160. Jabbour, H.N., et al., *Inflammatory pathways in female reproductive health and disease*. *Reproduction*, 2009. **138**(6): p. 903-19.
161. Brosens, I., J.J. Brosens, and G. Benagiano, *The eutopic endometrium in endometriosis: are the changes of clinical significance?* *Reprod Biomed Online*, 2012. **24**(5): p. 496-502.
162. van Gestel, I., et al., *Endometrial wave-like activity in the non-pregnant uterus*. *Hum Reprod Update*, 2003. **9**(2): p. 131-8.
163. Bulletti, C. and D. de Ziegler, *Uterine contractility and embryo implantation*. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2006. **18**(4): p. 473-84.
164. Garfield, R.E., S. Sims, and E.E. Daniel, *Gap junctions: their presence and necessity in myometrium during parturition*. *Science*, 1977. **198**(4320): p. 958-60.
165. Soloff, M.S., M. Alexandrova, and M.J. Fernstrom, *Oxytocin receptors: triggers for parturition and lactation?* *Science*, 1979. **204**(4399): p. 1313-5.
166. Fuchs, A.R., et al., *Oxytocin receptors in the human uterus during pregnancy and parturition*. *Am J Obstet Gynecol*, 1984. **150**(6): p. 734-41.
167. Breuiller, M., et al., *Adrenergic receptors in inner and outer layers of human myometrium near term: characterization of beta-adrenergic receptor sites by [125I]-iodocyanopindolol binding*. *Gynecol Obstet Invest*, 1987. **24**(1): p. 28-37.
168. Litime, M.H., et al., *Disappearance of beta-adrenergic response of human myometrial adenylate cyclase at the end of pregnancy*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1989. **69**(1): p. 1-6.
169. Timmons, B., M. Akins, and M. Mahendroo, *Cervical remodeling during pregnancy and parturition*. *Trends Endocrinol Metab*, 2010. **21**(6): p. 353-61.

170. Liggins, G., *Cervical ripening as an inflammatory reaction*, in *The Cervix in Pregnancy and Labour, Clinical and Biochemical Investigations*, E.D.A. ABM, Editor. 1981. p. 1-9.
171. Winkler, M. and W. Rath, *Changes in the cervical extracellular matrix during pregnancy and parturition*. *J Perinat Med*, 1999. **27**(1): p. 45-60.
172. Osmer, R.G., et al., *Biochemical events in cervical ripening dilatation during pregnancy and parturition*. *J Obstet Gynaecol (Tokyo 1995)*, 1995. **21**(2): p. 185-94.
173. Winkler, M., et al., *Interleukin-1beta and interleukin-8 concentrations in the lower uterine segment during parturition at term*. *Obstet Gynecol*, 1998. **91**(6): p. 945-9.
174. Ito, A., et al., *Tumor necrosis factor bifunctionally regulates matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) production by human fibroblasts*. *FEBS Lett*, 1990. **269**(1): p. 93-5.
175. Denison, F.C., A.A. Calder, and R.W. Kelly, *The action of prostaglandin E2 on the human cervix: stimulation of interleukin 8 and inhibition of secretory leukocyte protease inhibitor*. *Am J Obstet Gynecol*, 1999. **180**(3 Pt 1): p. 614-20.
176. Ekman, G., et al., *Cervical fetal fibronectin correlates to cervical ripening*. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 1995. **74**(9): p. 698-701.
177. Schmitz, T., et al., *Interleukin-1beta induces glycosaminoglycan synthesis via the prostaglandin E2 pathway in cultured human cervical fibroblasts*. *Mol Hum Reprod*, 2003. **9**(1): p. 1-8.
178. Chwalisz, K., et al., *Cervical ripening in guinea-pigs after a local application of nitric oxide*. *Hum Reprod*, 1997. **12**(10): p. 2093-101.
179. Thomson, A.J., et al., *Nitric oxide donors induce ripening of the human uterine cervix: a randomised controlled trial*. *Br J Obstet Gynaecol*, 1997. **104**(9): p. 1054-7.
180. Arikat, S., et al., *Separation of amnion from choriodecidua is an integral event to the rupture of normal term fetal membranes and constitutes a significant component of the work required*. *Am J Obstet Gynecol*, 2006. **194**(1): p. 211-7.
181. Malak, T.M. and S.C. Bell, *Structural characteristics of term human fetal membranes: a novel zone of extreme morphological alteration within the rupture site*. *Br J Obstet Gynaecol*, 1994. **101**(5): p. 375-86.
182. McLaren, J., T.M. Malak, and S.C. Bell, *Structural characteristics of term human fetal membranes prior to labour: identification of an area of altered morphology overlying the cervix*. *Hum Reprod*, 1999. **14**(1): p. 237-41.
183. Romero, R., et al., *The preterm parturition syndrome*. *Bjog*, 2006. **113 Suppl 3**: p. 17-42.
184. Csapo, A., *Progesterone block*. *Am J Anat*, 1956. **98**(2): p. 273-91.
185. Sugimoto, Y., et al., *Failure of parturition in mice lacking the prostaglandin F receptor*. *Science*, 1997. **277**(5326): p. 681-3.
186. Mitchell, B.F. and M.J. Taggart, *Are animal models relevant to key aspects of human parturition?* *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2009. **297**(3): p. R525-45.
187. Renthal, N.E., K.C. Williams, and C.R. Mendelson, *MicroRNAs--mediators of myometrial contractility during pregnancy and labour*. *Nat Rev Endocrinol*, 2013. **9**(7): p. 391-401.
188. Malpas, P., *Prematurity and malformation of the foetus*. *Obstet Gynaecol Br Emp* 1933. **40**: p. 1046-53.
189. Kendrick, J.W., P.C. Kennedy, and C. Stormont, *Adenohypophyseal aplasia, an inherited defect associated with abnormal gestation in Guernsey cattle*. *Cornell Vet*, 1957. **47**(1): p. 160-78.

190. Liggins, G.C., P.C. Kennedy, and L.W. Holm, *Failure of initiation of parturition after electrocoagulation of the pituitary of the fetal lamb*. Am J Obstet Gynecol, 1967. **98**(8): p. 1080-6.
191. Liggins, G.C., *Premature parturition after infusion of corticotrophin or cortisol into foetal lambs*. J Endocrinol, 1968. **42**(2): p. 323-9.
192. Challis, J.R., S.J. Lye, and J. Welsh, *Ovine fetal adrenal maturation at term and during fetal ACTH administration: evidence that the modulating effect of cortisol may involve cAMP*. Can J Physiol Pharmacol, 1986. **64**(8): p. 1085-90.
193. Liggins, G.C., *The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in preparing the fetus for birth*. Am J Obstet Gynecol, 2000. **182**(2): p. 475-7.
194. MacDonald, P.C., et al., *Initiation of human parturition. I. Mechanism of action of arachidonic acid*. Obstet Gynecol, 1974. **44**(5): p. 629-36.
195. Schultz, F.M., et al., *Initiation of human parturition. II. Identification of phospholipase A2 in fetal chorioamnion and uterine decidua*. Am J Obstet Gynecol, 1975. **123**(6): p. 650-3.
196. Smith, W.L., D.L. DeWitt, and R.M. Garavito, *Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology*. Annu Rev Biochem, 2000. **69**: p. 145-82.
197. Alfaidy, N., et al., *Expression of membrane prostaglandin E synthase in human placenta and fetal membranes and effect of labor*. Endocrine, 2003. **20**(3): p. 219-25.
198. Meadows, J.W., et al., *Expression and localization of prostaglandin E synthase isoforms in human fetal membranes in term and preterm labor*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(1): p. 433-9.
199. Sangha, R.K., et al., *Immunohistochemical localization, messenger ribonucleic acid abundance, and activity of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase in placenta and fetal membranes during term and preterm labor*. J Clin Endocrinol Metab, 1994. **78**(4): p. 982-9.
200. Cheung, P.Y., et al., *Localization of 15-hydroxy prostaglandin dehydrogenase in human fetal membranes, decidua, and placenta during pregnancy*. Gynecol Obstet Invest, 1992. **33**(3): p. 142-6.
201. Okazaki, T., et al., *Initiation of human parturition. XII. Biosynthesis and metabolism of prostaglandins in human fetal membranes and uterine decidua*. Am J Obstet Gynecol, 1981. **139**(4): p. 373-81.
202. Casey, M.L., et al., *Inactivation of prostaglandins in human decidua vera (parietalis) tissue: substrate specificity of prostaglandin dehydrogenase*. Am J Obstet Gynecol, 1989. **160**(1): p. 3-7.
203. Challis, J.R., F.A. Patel, and F. Pomini, *Prostaglandin dehydrogenase and the initiation of labor*. J Perinat Med, 1999. **27**(1): p. 26-34.
204. Romero, R., S.K. Dey, and S.J. Fisher, *Preterm labor: one syndrome, many causes*. Science, 2014. **345**(6198): p. 760-5.
205. Brown, N.L., et al., *Interleukin-1beta and bacterial endotoxin change the metabolism of prostaglandins E2 and F2alpha in intact term fetal membranes*. Placenta, 1998. **19**(8): p. 625-30.
206. Rajasingam, D., et al., *Stimulation of prostaglandin production from intact human fetal membranes by bacteria and bacterial products*. Placenta, 1998. **19**(4): p. 301-6.
207. Bennett, P.R., D.J. Henderson, and G.E. Moore, *Changes in expression of the cyclooxygenase gene in human fetal membranes and placenta with labor*. Am J Obstet Gynecol, 1992. **167**(1): p. 212-6.
208. Romero, R., et al., *Interleukin-1 stimulates prostaglandin biosynthesis by human amnion*. Prostaglandins, 1989. **37**(1): p. 13-22.

209. Premyslova, M., et al., *Differential expression and regulation of microsomal prostaglandin E(2) synthase in human fetal membranes and placenta with infection and in cultured trophoblast cells*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(12): p. 6040-7.
210. McLean, M., et al., *A placental clock controlling the length of human pregnancy*. Nat Med, 1995. **1**(5): p. 460-3.
211. Phillippe, M., *Cell-Free Fetal DNA, Telomeres, and the Spontaneous Onset of Parturition*. Reprod Sci, 2015.
212. Phillippe, M., *Cell-free fetal DNA--a trigger for parturition*. N Engl J Med, 2014. **370**(26): p. 2534-6.
213. Montalbano, A.P., S. Hawgood, and C.R. Mendelson, *Mice deficient in surfactant protein A (SP-A) and SP-D or in TLR2 manifest delayed parturition and decreased expression of inflammatory and contractile genes*. Endocrinology, 2013. **154**(1): p. 483-98.
214. Gao, L., et al., *Steroid receptor coactivators 1 and 2 mediate fetal-to-maternal signaling that initiates parturition*. J Clin Invest, 2015. **125**(7): p. 2808-24.
215. Billingham, R.E., L. Brent, and P.B. Medawar, *Actively acquired tolerance of foreign cells*. Nature, 1953. **172**(4379): p. 603-6.
216. Delage, G., et al., *Bases immunologiques de la mise en route du travail*. JTA, 1994.
217. Erlebacher, A., *Mechanisms of T cell tolerance towards the allogeneic fetus*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(1): p. 23-33.
218. Bulmer, J.N., P.J. Williams, and G.E. Lash, *Immune cells in the placental bed*. Int J Dev Biol, 2010. **54**(2-3): p. 281-94.
219. Erlebacher, A., *Immunology of the maternal-fetal interface*. Annu Rev Immunol, 2013. **31**: p. 387-411.
220. Trundley, A. and A. Moffett, *Human uterine leukocytes and pregnancy*. Tissue Antigens, 2004. **63**(1): p. 1-12.
221. King, A., et al., *CD3- leukocytes present in the human uterus during early placentation: phenotypic and morphologic characterization of the CD56++ population*. Dev Immunol, 1991. **1**(3): p. 169-90.
222. Trowsdale, J. and A.G. Betz, *Mother's little helpers: mechanisms of maternal-fetal tolerance*. Nat Immunol, 2006. **7**(3): p. 241-6.
223. Kopcow, H.D., et al., *Human decidual NK cells from gravid uteri and NK cells from cycling endometrium are distinct NK cell subsets*. Placenta, 2010. **31**(4): p. 334-8.
224. Kitaya, K., et al., *IL-15 expression at human endometrium and decidua*. Biol Reprod, 2000. **63**(3): p. 683-7.
225. Keskin, D.B., et al., *TGFbeta promotes conversion of CD16+ peripheral blood NK cells into CD16- NK cells with similarities to decidual NK cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(9): p. 3378-83.
226. Manaster, I., et al., *Endometrial NK cells are special immature cells that await pregnancy*. J Immunol, 2008. **181**(3): p. 1869-76.
227. Moffett, A. and F. Colucci, *Co-evolution of NK receptors and HLA ligands in humans is driven by reproduction*. Immunol Rev, 2015. **267**(1): p. 283-97.
228. Chazara, O., S. Xiong, and A. Moffett, *Maternal KIR and fetal HLA-C: a fine balance*. J Leukoc Biol, 2011. **90**(4): p. 703-16.
229. Hanna, J., et al., *Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface*. Nat Med, 2006. **12**(9): p. 1065-74.
230. Zhang, J., et al., *Natural killer cell-triggered vascular transformation: maternal care before birth?* Cell Mol Immunol, 2011. **8**(1): p. 1-11.

231. Hu, Y., et al., *Decidual NK cells alter in vitro first trimester extravillous cytotrophoblast migration: a role for IFN-gamma*. J Immunol, 2006. **177**(12): p. 8522-30.
232. Hazan, A.D., et al., *Vascular-leukocyte interactions: mechanisms of human decidual spiral artery remodeling in vitro*. Am J Pathol, 2010. **177**(2): p. 1017-30.
233. Hiby, S.E., et al., *Maternal activating KIRs protect against human reproductive failure mediated by fetal HLA-C2*. J Clin Invest, 2010. **120**(11): p. 4102-10.
234. Moffett, A. and Y.W. Loke, *The immunological paradox of pregnancy: a reappraisal*. Placenta, 2004. **25**(1): p. 1-8.
235. Houser, B.L., et al., *Two unique human decidual macrophage populations*. J Immunol, 2011. **186**(4): p. 2633-42.
236. Bulmer, J.N., D. Pace, and A. Ritson, *Immunoregulatory cells in human decidua: morphology, immunohistochemistry and function*. Reprod Nutr Dev, 1988. **28**(6B): p. 1599-613.
237. Houser, B.L., *Decidual macrophages and their roles at the maternal-fetal interface*. Yale J Biol Med, 2012. **85**(1): p. 105-18.
238. Gordon, S. and P.R. Taylor, *Monocyte and macrophage heterogeneity*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(12): p. 953-64.
239. Nagamatsu, T. and D.J. Schust, *The immunomodulatory roles of macrophages at the maternal-fetal interface*. Reprod Sci, 2010. **17**(3): p. 209-18.
240. Nagamatsu, T. and D.J. Schust, *The contribution of macrophages to normal and pathological pregnancies*. Am J Reprod Immunol, 2010. **63**(6): p. 460-71.
241. Vacca, P., et al., *Crosstalk between decidual NK and CD14+ myelomonocytic cells results in induction of Tregs and immunosuppression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(26): p. 11918-23.
242. Abrahams, V.M., et al., *Macrophages and apoptotic cell clearance during pregnancy*. Am J Reprod Immunol, 2004. **51**(4): p. 275-82.
243. Jaiswal, M.K., et al., *Regulation of apoptosis and innate immune stimuli in inflammation-induced preterm labor*. J Immunol, 2013. **191**(11): p. 5702-13.
244. Ben Amara, A., et al., *Placental macrophages are impaired in chorioamnionitis, an infectious pathology of the placenta*. J Immunol, 2013. **191**(11): p. 5501-14.
245. Kim, J.S., et al., *Distribution of CD14+ and CD68+ macrophages in the placental bed and basal plate of women with preeclampsia and preterm labor*. Placenta, 2007. **28**(5-6): p. 571-6.
246. Erlebacher, A., et al., *Constraints in antigen presentation severely restrict T cell recognition of the allogeneic fetus*. J Clin Invest, 2007. **117**(5): p. 1399-411.
247. Collins, M.K., C.S. Tay, and A. Erlebacher, *Dendritic cell entrapment within the pregnant uterus inhibits immune surveillance of the maternal/fetal interface in mice*. J Clin Invest, 2009. **119**(7): p. 2062-73.
248. Volchek, M., et al., *Lymphatics in the human endometrium disappear during decidualization*. Hum Reprod, 2010. **25**(10): p. 2455-64.
249. Tilburgs, T., F.H. Claas, and S.A. Scherjon, *Elsevier Trophoblast Research Award Lecture: Unique properties of decidual T cells and their role in immune regulation during human pregnancy*. Placenta, 2010. **31** Suppl: p. S82-6.
250. Nancy, P. and A. Erlebacher, *T cell behavior at the maternal-fetal interface*. Int J Dev Biol, 2014. **58**(2-4): p. 189-98.
251. Munn, D.H., et al., *Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism*. Science, 1998. **281**(5380): p. 1191-3.
252. Nancy, P., et al., *Chemokine gene silencing in decidual stromal cells limits T cell access to the maternal-fetal interface*. Science, 2012. **336**(6086): p. 1317-21.

253. Aluvihare, V.R., M. Kallikourdis, and A.G. Betz, *Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus*. *Nat Immunol*, 2004. **5**(3): p. 266-71.
254. Somerset, D.A., et al., *Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset*. *Immunology*, 2004. **112**(1): p. 38-43.
255. Campbell, D.J. and M.A. Koch, *Treg cells: patrolling a dangerous neighborhood*. *Nat Med*, 2011. **17**(8): p. 929-30.
256. Rowe, J.H., et al., *Pregnancy imprints regulatory memory that sustains anergy to fetal antigen*. *Nature*, 2012. **490**(7418): p. 102-6.
257. Samstein, R.M., et al., *Extrathymic generation of regulatory T cells in placental mammals mitigates maternal-fetal conflict*. *Cell*, 2012. **150**(1): p. 29-38.
258. Norwitz, E.R., et al., *Molecular Regulation of Parturition: The Role of the Decidual Clock*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2015.
259. Matthew Ritchie, J.S., James Wettenhall, Natalie, M.L. Thorne, Egil Ferkingstad, Marcus Davy, Francois Pepin, Dongseok Choi, Davis McCarthy,, and A.O. Di Wu, Carolyn de Graaf, Yifang Hu, Wei Shi and Belinda Phipson. *limma: Linear Models for Microarray Data*. 2012; Available from: <http://bioinf.wehi.edu.au/limma>.
260. Simon, A. and E. Biot, *ANALIS: analysis of NimbleGen arrays interface*. *Bioinformatics*, 2010. **26**(19): p. 2468-9.
261. Borghese, B., et al., *Gene expression profile for ectopic versus eutopic endometrium provides new insights into endometriosis oncogenic potential*. *Mol Endocrinol*, 2008. **22**(11): p. 2557-62.
262. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
263. Assenov, Y., et al., *Comprehensive Analysis of DNA Methylation Data with RnBeads*. <http://rnbeads.mpi-inf.mpg.de>, 2014.
264. Maksimovic, J., L. Gordon, and A. Oshlack, *SWAN: Subset-quantile within array normalization for illumina infinium HumanMethylation450 BeadChips*. *Genome Biol*, 2012. **13**(6): p. R44.
265. Ritchie, M.E., et al., *Empirical array quality weights in the analysis of microarray data*. *BMC Bioinformatics*, 2006. **7**: p. 261.
266. Mathian, A., et al., *Activated and resting regulatory T cell exhaustion concurs with high levels of interleukin-22 expression in systemic sclerosis lesions*. *Ann Rheum Dis*, 2012. **71**(7): p. 1227-34.
267. Messaoudene, M., et al., *Mature cytotoxic CD56(bright)/CD16(+) natural killer cells can infiltrate lymph nodes adjacent to metastatic melanoma*. *Cancer Res*. **74**(1): p. 81-92.
268. Schmitz, T., et al., *PDE4 inhibition prevents preterm delivery induced by an intrauterine inflammation*. *J Immunol*, 2007. **178**(2): p. 1115-21.
269. El Khwad, M., et al., *Fetal membranes from term vaginal deliveries have a zone of weakness exhibiting characteristics of apoptosis and remodeling*. *J Soc Gynecol Investig*, 2006. **13**(3): p. 191-5.
270. Nhan-Chang, C.L., et al., *Characterization of the transcriptome of chorioamniotic membranes at the site of rupture in spontaneous labor at term*. *Am J Obstet Gynecol*, 2010. **202**(5): p. 462 e1-41.
271. Norwitz, E.R., et al., *Expression of intermediate filament in endometrial glands changes with the onset of pregnancy and in endometriosis*. *Hum Reprod*, 1991. **6**(10): p. 1470-3.

272. Stanek, J., *Hypoxic patterns of placental injury: a review*. Arch Pathol Lab Med, 2013. **137**(5): p. 706-20.
273. Arimoto, T., et al., *Genome-wide cDNA microarray analysis of gene-expression profiles involved in ovarian endometriosis*. Int J Oncol, 2003. **22**(3): p. 551-60.
274. Jin, H.Y. and L.S. Zhou, [*Ultrastructural change of the ectopic endometrium and its significance in endometriosis*]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2010. **30**(6): p. 1318-20.
275. Moberg, C., et al., *Levels of oestrogen receptor, progesterone receptor and alphaB-crystallin in eutopic endometrium in relation to pregnancy in women with endometriosis*. Hum Fertil (Camb), 2014: p. 1-8.
276. Benaglia, L., et al., *Pregnancy outcome in women with endometriomas achieving pregnancy through IVF*. Hum Reprod, 2012. **27**(6): p. 1663-7.
277. Fernando, S., et al., *Preterm birth, ovarian endometriomata, and assisted reproduction technologies*. Fertil Steril, 2009. **91**(2): p. 325-30.
278. Harb, H.M., et al., *The effect of endometriosis on in vitro fertilisation outcome: a systematic review and meta-analysis*. BJOG, 2013. **120**(11): p. 1308-20.
279. Vercellini, P., et al., *Pregnancy outcome in women with peritoneal, ovarian and rectovaginal endometriosis: a retrospective cohort study*. BJOG, 2012. **119**(12): p. 1538-43.
280. Conti, N., et al., *Women with endometriosis at first pregnancy have an increased risk of adverse obstetric outcome*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2014: p. 1-16.
281. Riley, J.K. and W.M. Yokoyama, *NK cell tolerance and the maternal-fetal interface*. Am J Reprod Immunol, 2008. **59**(5): p. 371-87.
282. Moffett, A. and F. Colucci, *Uterine NK cells: active regulators at the maternal-fetal interface*. J Clin Invest, 2014. **124**(5): p. 1872-9.

