

# Rôles de l'adiponectine à l'interface foeto-maternelle humaine au cours du premier trimestre de grossesse Fabien Duval

### ▶ To cite this version:

Fabien Duval. Rôles de l'adiponectine à l'interface foeto-maternelle humaine au cours du premier trimestre de grossesse. Embryologie et organogenèse. Université Paris Saclay (COmUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLV070 . tel-01714540

## HAL Id: tel-01714540 https://theses.hal.science/tel-01714540

Submitted on 21 Feb 2018  $\,$ 

**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

# Rôles de l'adiponectine à l'interface fœto-maternelle humaine au cours du premier trimestre de grossesse

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay préparée à l'Université de Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines

> École doctorale n°577 Structure et Dynamique des Systèmes Vivants (SDSV)

Thèse présentée et soutenue à Montigny-le-Bretonneux, le 10 novembre 2017, par

## **Monsieur Fabien Duval**

**Composition du Jury :** 

Madame Joëlle Dupont Directrice de Recherches, UMR-85, INRA, Tours	Rapporteur
Madame Nathalie Lédée Praticien Hospitalier, UMR-976, INSERM, Paris Diderot	Rapporteur
Monsieur Thierry Fournier Directeur de Recherches, UMR-1139, INSERM, Paris Descartes	Examinateur
Madame Anne Tarrade Chargée de Recherches, UMR-1198, INRA, Jouy-en-Josas	Examinateur
Madame Marie-Noëlle Dieudonné Professeur des Universités, EA-7404, Université Paris-Saclay	Directeur de thèse
Madame Joëlle Dupont	

Directrice de Recherches, UMR-85, INRA, Tours Président du jury

A Lahna,

« Anything is possible if you've got enough nerve » J.K. Rowling

### REMERCIEMENTS

J'adresse mes remerciements en premier lieu à l'ensemble des membres du jury qui ont évalué ce travail de thèse. Merci au Dr. Joëlle Dupont et au Dr. Nathalie Lédée pour avoir accepté le rôle de rapporteur. Je vous remercie également pour votre présence et toutes vos remarques constructives au cours des différents comités de thèse. Merci au Dr. Thierry Fournier et au Dr. Anne Tarrade d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je souhaite remercier le Pr. François Vialard pour son accueil au sein de l'EA 7404 - Gamètes Implantation Gestation. Merci de m'avoir fait confiance en me permettant de continuer les travaux entrepris au cours de mon stage de Master 2 au sein de l'équipe. Je tiens également à remercier l'Institut de Recherche en Santé de la Femme qui a financé mes trois années de doctorat.

Un grand merci à ma directrice de thèse, le Pr. Marie-Noëlle Dieudonné pour m'avoir ouvert les portes du laboratoire en me proposant ce travail de recherche. Je te remercie pour ta présence quotidienne, tes enseignements et pour la liberté que tu m'as laissée dans la conduite de ce projet de thèse. Je souhaite à tous les doctorants d'être encadrés comme je l'ai été au cours de ces trois années.

Merci à l'ensemble des membres de l'équipe GIG pour leur accueil. Merci d'avoir participé à mon évolution tant sur le plan scientifique que sur le plan personnel et professionnel. Je remercie plus particulièrement le Dr. Esther Dos Santos pour son implication dans ce projet, sa gentillesse et pour avoir contribué pleinement à ma formation scientifique. Merci au Dr. Valérie Sérazin pour son aide précieuse lors de l'analyse de données de RT-qPCR et pour m'avoir permis de réaliser l'ensemble des dosages au sein du service du Biologie Médicale du CHI de Poissy-Saint-Germain-en-Laye. Je tiens également à remercier le Pr. Philippe de Mazancourt pour m'avoir accueilli dans son laboratoire lors de mon stage de Master 2 et qui a donc été l'un des initiateurs de ce travail de thèse.

Merci à Maryse de Hauteur. Pour votre soutien constant, vos nombreux conseils et votre bonne humeur quotidienne qui ont rythmé mes trois années de thèse.

Je remercie le Dr. Benoît Maury pour ses enseignements en microscopie confocale. Merci pour la grande patience dont tu as fait preuve avec moi. Merci à Patricia Facchinetti pour ses conseils et son savoirfaire en immunohistochimie.

J'adresse également mes remerciements à l'ensemble des équipes du département de Biologie de la Reproduction, Cytogénétique, Gynécologie et Obstétrique du CHI de Poissy-Saint-Germain-en-Laye pour leur participation active à la réussite de ce travail. Je tiens notamment à remercier le Dr. Héloïse Gronier, le Dr. Khadija Fathallah et le Dr. Nelly Swierkowski-Blanchard pour leur implication dans ce projet. Merci pour votre efficacité lors de l'inclusion des patientes et le recueil des échantillons. Je remercie également l'ensemble des patientes qui ont participé à cette étude.

Merci à tous les étudiants qui sont passés par le laboratoire au cours de ce travail : Delphine, Sandra, Rita, Laurent, Malha, Marine, Cécile, Eliza, Pauline... Je remercie plus particulièrement les étudiants que j'ai encadrés. Merci à Lucie Arras, Guillaume Groffe et Julien Tardieu pour leur aide technique et leur intérêt pour mon travail de thèse.

Merci également aux doctorantes avec qui j'ai partagé cette aventure. Je remercie Dorothée Poidatz pour ses nombreux conseils à mon arrivée au laboratoire et Perrine Nogues pour sa présence au cours de cette difficile dernière année de thèse. Un énorme merci à Hadia Moindjie pour avoir égayé mes journées avec ta bonne humeur (quasi) quotidienne. Merci d'avoir été l'un de mes plus grands soutiens au cours de ces trois dernières années. Je souhaite que tu te fasses la place que tu mérites dans le monde de la Recherche.

Merci à toute la famille Duval-Léquibain pour les nombreux week-ends, les cousinades et les sorties qui ont brisé la monotonie du quotidien. Merci notamment à Marion, pour ta présence et ton soutien depuis... 26 ans ! Un grand merci à mon cousin/ami Benjamin pour tout ce que tu as pu faire pour moi ces dernières années. Merci pour ton écoute, tes conseils et ton humour si particulier, notamment pendant la période de rédaction. Tu as été un véritable soutien. *You are my person !* 

• 3 •

Un immense merci à mes parents pour leurs encouragements permanents. Merci d'être à l'écoute de mes attentes et de me donner les moyens de réaliser chacun de mes projets. Merci à Arnaud et Cédric pour votre présence et votre soutien. Je remercie infiniment ma sœur, Julie. Pour les nombreux conseils et toutes les attentions. Merci d'être un repère et un guide pour moi depuis toujours.

Enfin, merci à Lahna.

# TABLE DES MATIÈRES

Remerciements	2
Table des matières	5
Liste des abréviations	9
Liste des figures	. 13
Liste des tableaux	. 15
PARTIE 1 Introduction	. 16
Chapitre 1   L'unité fœto-maternelle	. 17
A. Apparition de la placentation chez les vertébrés	17
B. L'appareil reproducteur féminin	20
1. Les ovaires	21
2. L'utérus	23
C. L'endomètre	24
1. Evolution de l'endomètre au cours du cycle menstruel	24
2. Evolution de l'endomètre au cours de la vie de la femme	27
D. L'implantation embryonnaire	29
1. Apposition et adhésion du blastocyste	30
<ol> <li>Invasion trophoblastique</li> </ol>	31
E. Le développement placentaire	32
1. Formation de la villosité choriale	
2 La lignée villeuse	33
3 La lignée extravilleuse	35
F l'immunologie de la grossesse	37
1 l'immunotolérance de l'endomètre	37
2 L'antigénicité du trophoblaste	40
G Structure de l'unité fœto-maternelle	42
1 Particularités du placenta de premier trimestre	42
<ol> <li>Particularités du pracenta de premier triméstre</li> <li>Mise en place de la placentation hámochoriale</li> </ol>	. 42
2. Mise en place de la placentation nemocrionale	. 45
1. L'andomètre : un tiscu d'angrage	. 45
2. L'andomètre : un tissu nourrisier	45
2. L'endemètre : un tissu paracrine et endecrine	40 E 1
5. L'endonnetie : un tissu parachine et endocrine	57
Koles du placenta dans l'unite rœto-matemene	57
1. La fonction d'échanges	57
2. La fonction de protection	04
S. La folicion de protection	00
Chapitre 2   Régulation du dialogue fœto-maternel	. 72
A. La grossesse saine	72
B. La maturation endométriale	73
1. La progestérone	74
2. Les facteurs endométriaux	76
3. Les facteurs trophoblastiques	77
4. Les perturbations de la décidualisation	77

C.		La réceptivité utérine	79
	1.	Les hormones ovariennes	80
	2.	Le LIF	84
D.		L'invasion trophoblastique	84
	1.	Les acteurs moléculaires de l'invasion	85
	2.	Les hormones placentaires	90
	3.	Les cytokines	92
	4.	Les facteurs de croissance	93
E.		La croissance fœtale	93
	1.	La surface d'échange placentaire	94
	2.	L'apoptose trophoblastique	95
	3.	La régulation du transport de nutriments	99
F.		Dérégulations du dialogue fœto-maternel et pathologies associées	102
	1.	L'endométriose	102
	2.	Les échecs répétés d'implantation	104
	3.	Les fausses-couches spontanées à répétition	107
	4.	Le placenta accreta	109
	5.	La pré-éclampsie	110
	6.	Le retard de croissance intra-utérin	113
	7.	Le diabète gestationnel et la macrosomie	115
-	•		
Cha	pit	re 3   L'adiponectine	117
Α.		Le tissu adipeux : un organe biologiquement actif	117
В.		Les adipokines	118
	1.	La leptine	118
	2.	La résistine	122
	3.	La chémérine	124
	4.	La visfatine	127
C.		L'adiponectine	129
	1.	Découverte de l'adiponectine	129
	2.	Structure du gène de l'adiponectine	130
	3.	Structure de la protéine	131
D.		Mécanismes de régulation de l'expression de l'adiponectine	133
	1.	Les facteurs de transcription	133
	2.	Le statut métabolique	135
	3.	Les facteurs de l'inflammation	137
	4.	Les stress cellulaires	137
	5.	Les facteurs hormonaux	138
	6.	Le système nerveux sympathique	140
	7.	Les agents pharmacologiques	140
	8.	Les facteurs exogènes	141
	9.	Autorégulation	141
E.		Le signal « Adiponectine »	142
	1.	Les récepteurs ADIPOR1 et ADIPOR2	142
	2.	Les protéines APPL1 et APPL2	144
	3.	Les autres récepteurs de l'adiponectine	145
	4.	Les voies de signalisation régulées par l'adiponectine	146
F.		Adiponectine et homéostasie énergétique	151
	1.	La production d'insuline	151
	2.	Le métabolisme glucidique	151
	3.	Le métabolisme lipidique	152
	4.	La fonction mitochondriale	152
	5.	Les récepteurs ADIPOR : de potentielles cibles thérapeutiques	154

G. Adiponectine et cycle cellulaire	155
1. La balance prolifération / apoptose	155
2. La différenciation cellulaire	156
H. Adiponectine et immunité / inflammation	156
I. Adiponectine et fonction de reproduction	158
1. Apport des modèles animaux	158
2. Adiponectine et axe hypothalamo-hypophysaire	159
3. Adiponectine et ovaire	160
4. Adiponectine et endomètre	
J. Adiponectine et grossesse	
1. Cinétique de l'adiponectinémie maternelle	
2. Adiponectine et placenta	
3. Adiponectine et pathologies de la grossesse	164
PARTIE 2 Démarche expérimentale	166
Présentation du laboratoire	167
Contexte de recherche	168
Objectifs du travail de thèse	169
Collaborations avec le CHI de Poissy-Saint-Germain-en-Laye (CHIPS)	170
	470
PARTIE 3 Resultats	1/2
Chapitre 1   Décidualisation et contrôle de l'invasion	173
ARTICLE 1	
Introduction	
Matériels et Méthodes	175
Résultats et Conclusions	178
Discussion	
Chapitre 2   Fausses-couches à répétition et adipokines	
ABTICLE 2	182
Introduction.	
Matériels et Méthodes	
Résultats et Conclusions	
Discussion	
	100
Chapitre 3   Nutrition histiotrophe et giycogene	
ARTICLE 3	
Materiels et Methodes	191
Resultats et Conclusions	
Discussion	
Chapitre 4   Métabolisme et apoptose placentaires	199
ARTICLE 4	199
Introduction	200
Matériels et Méthodes	201
Résultats et Conclusions	204
Discussion	206
PARTIE 4 Discussion & Perspectives	
A. Présentation des résultats de thèse	
B. L'adiponectine : un acteur clé de l'implantation embryonnaire	
1. L'adiponectine : un biomarqueur du placenta accreta ?	
2. Etude de la réceptivité utérine <i>in vitro</i>	
· ·	
3. Etude de la réceptivité utérine <i>in vivo</i>	

4. L'adiponectine : un biomarqueur des échecs répétés d'implantation ?	216
C. L'adiponectine : un régulateur de la croissance fœtale	217
1. Rôles de l'adiponectine au cours de la nutrition histiotrophe	218
2. Rôles de l'adiponectine au cours de la nutrition hémotrophe	219
3. L'adiponectine : un biomarqueur des pathologies de la croissance fœtale ?	220
D. Obésité maternelle et croissance fœtale	221
E. Conclusion	223
Références	224
Publications annexes	253
Annexe 1   Grossesses pathologiques et mitochondries	254
ARTICLE 5	254
Annexe 2   Adipokines et interface fœto-maternelle	255
REVUE	255
Communications orales et posters	256
Communications orales	257
Posters	258

# LISTE DES ABRÉVIATIONS

11β-HSD1	11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1
3β-HSD	3β- hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase
4E-BP1	4E binding protein 1
ACO	Acyl-coA oxydase
ACRP30	Adipocyte complement related protein of 30 kDa
ADAM	A desintegrin and metalloproteinase
ADIPOR	Adiponectin receptor
ADN	Acide désoxyribonucléique
AgRP	Agouti related protein
AMP	Adénosine monophosphate
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AMPK	AMP-activated protein kinase
APAF-1	Apoptotic protease activating factor-1
apM1	Adipose most abundant gene transcript 1
APPL	Adaptator protein containing pleckstrin homology and phosphotyrosine domains and leucine zipper motif
AR	Androgen receptor
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BAK	BCL-2 homologous antagonist killer
BAX	BCL-2 associated protein X
BCL-2	B-cell lymphoma-2
BMP	Bone morphogenic protein
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
СаМККβ	Calcium/calmodulin-dependant kinase kinase beta
CAP1	Adenylyl cyclase-associated protein 1
CCRL2	C-chemokine receptor like 2
CDK	Cyclin-dependant kinase
CHIPS	Centre hospitalier intercommunal de Poissy-Saint-Germain-en-Laye
CHOP-10	C/EBP homologous protein-10
ChREBP	Carbohydrate-responsive element-binding protein
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMKLR1	Chemokine-like receptor 1
СО	Monoxyde de carbone
COUP-TFII	Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II
COX-2	Cyclo-oxygenase-2
CPT-1	Carnitine palmitoyl transferase-1
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response element-binding protein
CRF	Corticotropin-releasing factor
CSE	Cellule stromale endométriale
CTEV	Cytotrophoblaste extravilleux
CTV	Cytotrophoblaste villeux
DAX1	Dosage-sensitive sex revearsal adrenal hypoplasia critical region on chromosome X gene 1
DHEAS	Dehydroepiandrosterone sulfate
E1	Œstrone

E2	Estradiol
E3	Estriol
EEA-1	Early endosome antigen-1
EGF	Epithelial growth factor
EGF-R	Epithelial growth factor receptor
ER	Estrogen receptor
ERE	Estrogen-response element
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
Ero1L-α	Endoplasmic reticulum oxidoreductase-1-like alpha
ERp44	Endoplasmic reticulum protein of 44 kDa
ERR	Estrogen related receptor
Ets-1	E26 transformation specific oncogene homolog-1
FABPpm	Fatty acid binding protein plasma membrane
FADD	Fas-associated death domain
FAT	Fatty acid translocase
FATP	Fatty acid transporter protein
FCSR	Fausses-couches spontanées à repetition
FGF	Fibroblast growth factor
FGF-R	Fibroblast growth factor receptor
FIZZ	Found in inflammatory zone
FLIP	Flice-like inhibitory protein
FoxL2	Forkhead box protein L2
FoxO1	Forkhead box O1
FSH	Follicle-stimulating hormone
GBP28	Gelatin-binding protein of 28 kDa
GH	Growth hormone
GLUT	Glucose transporter
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GnRH	Gonadotropin-releasing hormone
GP	Glycogen phosphorylase
GFPR1	G protein-coupled receptor 1
GS	Glycogen synthase
GSK3β	Glycogen synthase kinase 3 beta
HAND2	Hand and neural crest derivatives expressed transcript 2
HB-EGF	Heparin-binding-epithelial growth factor
hCG	Human chorionic gonadotropin
HIF-1	Hypoxia inducible factor-1
HLA	Human leucocyte antigen
HMW	High molecular weight
hPGH	Human placental growth hormone
hPL	Human placental lactogen
HTRA2	High-temperature requirement protein 2
IAP	Inhibitor of apoptosis protein
Id3	Inhibitor of differentiation 3
IGF	Insulin-like growth factor
IGFBP-1	Insulin-like growth factor-binding protein-1
IHH	Indian hedgehog homolog
IL	Interleukin
IMC	Indice de masse corporelle
IR	Insulin-receptor
IR IRS	Insulin-receptor Insulin receptor substrate

JAK	Janus kinase
JNK	Jun N-terminal kinase
KISS1-R	Kisspeptin receptor
KLF8	Krüppel-like factor 8
LAMP-1	Lysosomal-associated membrane protein-1
LAT	L-type amino acid transporter
LDL	Low density lipoprotein
LH	Luteinizing hormone
LH3	Lysyl-hydroxylase 3
LIF	Leukemia inhibitory factor
LIF-R	Leukemia inhibitory factor receptor
LMW	Low molecular weight
LRH-1	Liver receptor homolog-1
LTh	Lymphocyte T helper
LTreg	Lymphocyte T regulator
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MEC	Matrice extra-cellulaire
MIC-1	Macrophage inhibitory cytokine-1
MKK-3	MAPK kinase kinase 3
MLN64	Metastatic lymph node 64
MMP	Matrix metalloproteinase
MMW	Middle molecular weight
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MUC	Mucin
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NFATc4	Nuclear factor of activated T cells 4
NF-KB	Nuclear factor kappa B
NO	Oxyde nitrique
NPY	Neuropentide V
NRF	Nuclear respiratory factor
Ob-R	Lentin recentor
PAI	Plasminogen activator inhibitor
PRFF	Pre B-cell colony-enhancing factor
PDK-1	Phosphoinositide_dependent kinase 1
PEPCK	Phosphoenolpyruvate carbovykinase
PGC1-a	PPARy coactivator 1-alpha
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIF	Preimplantation factor
Dit 1	Pituitary specific positive transcriptor 1
	Protain kinase A
PIGE	Placental growth factor
	Placental protein 14
	Paravisame proliferator activated recentor commo
DD	Progesterene recenter
	Progesterone receptor
	Progesterone-response element
DTCU 1	Patahad 1
PICH-I	Patinoia agid regenter regnander 2
RAKKE52	Retard de araissance intre utérin
DE	Retaru de crofssance initia-diefini Rétioulum ondonlesmique
KE	Delevie conc
KLN DOD1	Relaxin gene
KUKI	Receptor tyrosine-kinase-like orphan receptor 1

ROS	Espèce reactive de l'oxygène
RSPO1	R-spondin 1
S.A	Semaine d'aménorrhée
S6K1	S6 kinase 1
SCP-2	Sterol carrier protein-2
SCPP	Secretory calcium-binding phosphoprotein
SH3	Src homology domain 3
SIRT1	Sirtuin 1
SMAC	Second mitochondria-derivated activator of caspase
SNAT	Sodium-coupled neutral amino acid transporter
sPLA2	Secretory phospholipase 2
SREBP-1c	Sterol-regulatory element-binding protein-1c
SRY	Sex-determining region of Y chromosome
ST	Syncytiotrophoblaste
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TAK-1	TGF-β-activated kinase-1
TfnR	Transferrin receptor
TGF <b>-</b> β	Transforming growth factor beta
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase
TLR-4	Toll-like receptor-4
TNF-R	Tumor necrosis factor receptor
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha
TP53	Tumor protein of 53 kDa
TRAIL	TNF-related apoptosis-binding ligand
TRAIL-R	TNF-related apoptosis-binding ligand receptor
TSC	Tuberous sclerosis complex
uNK	Uterine natural killer
uPA	Urokinase plasminogen activator
uPA-R	Urokinase plasminogen activator receptor
VEGF	Vacular endothelial growth factor
VIT	Vitellogenin
VLDL	Very low density lipoprotein
WNT4	Wingless-type MMTV integration site family member 4
XAF1	XIAP-associated factor-1
ZO-1	Zona occludens-1
ZP	Zona protein

## LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. EVENEMENTS GENETIQUES CONDUISANT A L'APPARITION DES MAMMIFERES	18
Figure 2. Determinisme sexuel feminin	21
FIGURE 3. LES STADES DE DEVELOPPEMENT DES FOLLICULES OVARIENS.	22
FIGURE 4. COUPE HISTOLOGIQUE TRANSVERSALE DE L'UTERUS HUMAIN	24
FIGURE 5. REGULATION DU CYCLE MENSTRUEL PAR LES HORMONES OVARIENNES	27
FIGURE 6. COUPE SAGITTALE SCHEMATIQUE D'UN UTERUS EN DEBUT DE GESTATION	29
FIGURE 7. ECLOSION D'UN BLASTOCYSTE IN VITRO.	30
FIGURE 8. L'IMPLANTATION EMBRYONNAIRE HUMAINE.	32
FIGURE 9. DEVELOPPEMENT ET STRUCTURE DEFINITIVE DE LA VILLOSITE CHORIALE.	33
FIGURE 10. FORMATION DU SYNCYTIOTROPHOBLASTE	35
FIGURE 11. ACQUISITION D'UN PHENOTYPE INVASIF PAR LES CYTOTROPHOBLASTES EXTRAVILLEUX.	37
FIGURE 12. ENSEMBLE DES EVENEMENTS CONDUISANT A L'IMMUNOTOLERANCE MATERNELLE.	41
FIGURE 13. ORGANISATION DE LA CIRCULATION SANGUINE DE LA PLACENTATION HUMAINE HEMOCHORIALE	42
FIGURE 14. REMODELAGE DES ARTERES UTERINES ET MISE EN PLACE DE LA PLACENTATION HEMOCHORIALE	44
FIGURE 15. COMPARAISON DE L'INVASION TROPHOBLASTIQUE ET DE L'INVASION TUMORALE.	47
FIGURE 16. MECANISMES REGULANT L'ANCRAGE DES CELLULES TROPHOBLASTIQUES DANS L'ENDOMETRE.	48
FIGURE 17. SECRETION APOCRINE DU GLYCOGENE ET DES LIPIDES PAR LES CELLULES DECIDUALES GLANDULAIRES	50
FIGURE 18. MECANISMES DE LA NUTRITION HISTIOTROPHE.	51
Figure 20. Synthese des œstrogenes par le syncytiotrophoblaste.	61
FIGURE 19. SYNTHESE DE LA PROGESTERONE PAR LE SYNCYTIOTROPHOBLASTE.	62
FIGURE 21. COUPE TRANSVERSALE DES VILLOSITES CHORIALES.	66
FIGURE 22. DUREE EN S.A DE LA GROSSESSE PREMATUREE, A TERME ET PROLONGEE	72
FIGURE 23. ROLES DE LA PROGESTERONE ET DE L'AMP CYCLIQUE AU COURS DE LA DECIDUALISATION.	76
FIGURE 24. ROLE DE LA PROGESTERONE DANS LE DIALOGUE ENTRE LE COMPARTIMENT STROMAL ET EPITHELIAL.	83
FIGURE 25. STRUCTURE DES PRO-MMP	86
FIGURE 26. REGULATION DE L'ACTIVITE DE LA PLASMINE	88
FIGURE 27. HOMEOSTASIE CELLULAIRE DE LA LIGNEE TROPHOBLASTIQUE VILLEUSE	95
FIGURE 28. INDUCTION DE L'APOPTOSE DE LA CELLULE TROPHOBLASTIQUE	
FIGURE 29. LA VOIE MTOR EST UN SENSEUR METABOLIQUE DANS LE PLACENTA HUMAIN	99
FIGURE 30. ETIOLOGIES DES FAUSSES-COUCHES SPONTANEES A REPETITION.	108
FIGURE 31. DIFFERENTS STADES D'INVASION TROPHOBLASTIQUES ET PATHOLOGIES ASSOCIEES	109
FIGURE 32. DEFAUT D'INVASION TROPHOBLASTIQUE DANS LE CONTEXTE DE LA PRE-ECLAMPSIE	113

FIGURE 33. PHYSIOPATHOLOGIE DU DIABETE GESTATIONNEL ASSOCIE A LA MACROSOMIE FŒTALE	116
FIGURE 34. PRINCIPAUX ROLES DE LA LEPTINE DANS L'ORGANISME HUMAIN.	120
FIGURE 35. MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DE LA CHEMERINE.	125
FIGURE 36. STRUCTURE DU GENE DE L'ADIPONECTINE ET DE SA REGION PROMOTRICE	130
FIGURE 37. STRUCTURE DE L'ADIPONECTINE	
FIGURE 38. SITES DE MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DE L'ADIPONECTINE.	132
FIGURE 39. VARIATION DES TAUX D'ADIPONECTINE AU COURS DE LA PERIODE POST-PRANDIALE	136
FIGURE 40. REGULATION DE LA PRODUCTION ET DE LA SECRETION D'ADIPONECTINE.	
FIGURE 41. MODELE DE REGULATION "YIN-YANG" DU SIGNAL ADIPONECTINE PAR LES PROTEINES APPL.	145
FIGURE 42. IMPORTANCE DU CALCIUM LORS DE L'ACTIVATION DE L'AMPK PAR L'ADIPONECTINE	147
FIGURE 43. MECANISMES D'ACTIVATION DE LA VOIE PI3K/AKT.	
FIGURE 44. MECANISMES D'ACTIVATION DE LA PKA	
FIGURE 45. MECANISMES D'ACTIVATION DE LA P38-MAPK.	149
FIGURE 46. CROSS-TALK ENTRE LES VOIES DE L'ADIPONECTINE ET LA VOIE DU TNF-A	150
FIGURE 47. ACTIVATION DE LA CHAINE RESPIRATOIRE MITOCHONDRIALE ET SYNTHESE D'ATP.	153
FIGURE 48. REGULATION DE L'HOMEOSTASIE GLUCIDO-LIPIDIQUE PAR L'ADIPONECTINE.	154
Figure 49. Schema bilan des resultats.	210
FIGURE 50. ISOLEMENT DES CELLULES ENDOMETRIALES EPITHELIALES.	213
FIGURE 51. MODELE DE PERFUSION PLACENTAIRE.	220
FIGURE 52. EFFETS ANTAGONISTES DE L'ADIPONECTINE A L'INTERFACE FŒTO-MATERNELLE HUMAINE	222

# LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1. LES DIFFERENTS TYPES DE PLACENTATION.	19
TABLEAU 2. PRINCIPAUX FACTEURS PRODUITS PAR L'ENDOMETRE HUMAIN	56
TABLEAU 3. PRINCIPAUX FACTEURS PRODUITS PAR LE PLACENTA HUMAIN	64
TABLEAU 4. PRINCIPAUX AGENTS PATHOGENES TRAVERSANT LE PLACENTA ET COMPLICATIONS ASSOCIEES.	69
TABLEAU 5. ENZYMES ESSENTIELLES AU COURS DE L'IMPLANTATION EMBRYONNAIRE	85
TABLEAU 6. LES MMP ET LEURS PRINCIPAUX SUBSTRATS	87
TABLEAU 7. EVOLUTION DES DIFFERENTS PARAMETRES PLACENTAIRES AU COURS DE LA GROSSESSE HUMAINE.	
TABLEAU 8. LES PRINCIPALES CAUSES DES ECHECS REPETES D'IMPLANTATION.	105
TABLEAU 9. FACTEURS FAVORISANT LE DEVELOPPEMENT DE LA PRE-ECLAMPSIE.	111
TABLEAU 10. FACTEURS FAVORISANT LE DEVELOPPEMENT DU RETARD DE CROISSANCE IN UTERO.	114
TABLEAU 11. HYPOFERTILITE DE LA SOURIS (ADIPO <sup>-/-</sup> ) FEMELLE	159
TABLEAU 12. L'ADIPONECTINE ET LES PATHOLOGIES DE LA REPRODUCTION.	165

# PARTIE 1 INTRODUCTION

#### A. Apparition de la placentation chez les vertébrés

Dans le règne animal, le clade des **mammifères** regroupe toutes les espèces présentant la caractéristique fondamentale de l'**allaitement** des nouveau-nés par l'intermédiaire d'une sécrétion glandulaire appelée « lait maternel ». Totalement immatures à la naissance, les jeunes mammifères nécessitent des soins parentaux constants. A ce jour, plus de **5500 espèces vivantes** de mammifères ont été décrites et classées en trois grands groupes : les monotrèmes, les marsupiaux et les euthériens.

La divergence de la lignée des mammifères avec celles des espèces des reptiles et des oiseaux (espèces ovipares) semble remonter à 300 millions d'années environ, suite à des évènements génétiques impliquant l'apparition de la protéine du lait maternel, la **caséine**, et la disparition de la protéine du vitellus de l'œuf, la **vitellogénine (Figure 1)**. Deux gènes codant la vitellogénine (VIT-1 et VIT-ancestral) seraient apparus très tôt au cours de l'évolution des vertébrés. VIT-ancestral s'est ensuite dupliqué (VIT-2 et VIT-3) chez l'ancêtre commun des tétrapodes. Les reptiles et les oiseaux ont conservé l'expression de ces trois gènes codant la vitellogénine. A l'inverse, les premiers mammifères ont subi une perte de fonction progressive des gènes VIT. En parallèle, ils ont acquis les premiers gènes codant la caséine, suite à la duplication d'un gène ancestral de la famille des SCPP (secretory calcium-binding phosphoprotein) produisant des protéines liant le calcium (Brawand *et al.*, 2008).

Pourtant, quelques espèces de mammifères constituant le groupe des monotrèmes, expriment encore aujourd'hui un gène VIT (possiblement une forme chimère issue de la fusion de VIT-2 et VIT-3) et sont donc capables de synthétiser la vitellogénine. Les **monotrèmes** sont les mammifères qui ressemblent le plus aux petits mammifères primitifs et présentent une caractéristique surprenante : ils sont **ovipares**. Les œufs de ces espèces (ornithorynque, échidné) sont donc de type **télolécithe**, riches en réserves nutritives. Après éclosion, les nouveau-nés sont nourris par la mère, qui possède tout l'équipement génétique nécessaire pour produire un lait riche en caséine.

Les autres espèces de mammifères ont totalement perdu la capacité de produire la vitellogénine, suite à la perte de fonction de l'ensemble des gènes VIT au cours du processus évolutif. Leurs œufs sont dits **alécithes** c'est-à-dire dépourvus de réserves énergétiques. L'embryon se développe donc à l'intérieur de l'organisme maternel : la **viviparité** apparaît.





Modifié d'après Brawand *et al.* 2008. L'émergence de la lignée des mammifères est étroitement liée à la perte partielle (monotrèmes) ou totale (marsupiaux et euthériens) de l'équipement génétique nécessaire à la production de vitellogénine, la protéine du vitellus de l'œuf. Cette évolution s'accompagne de l'apparition des gènes codant la caséine, la protéine du lait maternel. Ainsi, qu'ils soient ovipares ou vivipares, l'ensemble des mammifères présente le caractère commun de l'allaitement des petits, de la naissance au sevrage.

Chez les **marsupiaux**, rassemblant des espèces emblématiques telles que le koala, le kangourou ou l'opossum, la femelle porte le petit durant une période de gestation très courte (inférieure à cinq semaines). Celui-ci est ensuite expulsé dans un état de développement rudimentaire (larve marsupiale) et migre vers les mamelles de la mère située dans la **poche marsupiale**. Il y sera nourri pendant plusieurs mois, jusqu'à atteindre un stade juvénile et autonome, mais encore immature. Il continuera donc d'être nourri par le lait maternel jusqu'au sevrage.

Les **euthériens** forment la sous-classe la plus importante de l'ordre des mammifères et regroupent toutes les espèces dites « placentaires ». Très tôt au cours de la gestation, l'embryon met en place un organe spécialisé dans l'apport de nutriments, lui permettant de se développer entièrement dans le corps de la mère : le **placenta**. Il semblerait donc que la mise en place de la placentation au cours de l'évolution des espèces, soit une conséquence directe de l'apparition de la lactation. La durée de gestation chez les euthériens est extrêmement variable d'une espèce à l'autre, allant de dix-huit jours chez la musaraigne, à vingt-deux mois chez l'éléphant. A la naissance, les petits sont nourris par le lait maternel.

Au sein même du groupe des euthériens, de grandes différences sont observées concernant la structure et la forme du placenta. Ainsi, les équidés et les cétacés par exemple, présentent un placenta **diffus** alors que le placenta des ruminants est de type **cotylédonaire**. L'ensemble des carnivores développent un placenta **zonaire**. Enfin, le placenta des primates et des rongeurs est **discoïdal**. Chacun de ces types de placenta est associé à un mode de placentation particulier (épithéliochorial, endothéliochorial, hémochorial) étroitement lié au potentiel invasif des cellules placentaires dans l'endomètre maternel (**Tableau 1**). L'essor des études phylogénétiques suggère que la placentation non-invasive de type épithéliochorial est une **forme évoluée** de placentation. En effet, il s'agirait d'une adaptation maternelle permettant de limiter le transport de nutriments de la mère vers le fœtus, sans que celle-ci n'ait besoin de moduler sa propre prise alimentaire (Vogel, 2005).

Placenta DIFFUS	Placenta COTYLEDONAIRE	Placenta ZONAIRE	Placenta DISCOÏDAL
EPITHELIOCHORIAL		ENDOTHELIO- CHORIAL	HEMOCHORIAL
L'épithélium utérin et les vaisseaux maternels sont intacts.		L'épithélium utérin est détruit.	L'épithélium et les vaisseaux utérins sont remodelés.
Six couches cellulaires séparent le sang maternel et le sang fœtal.		Quatre couches cellulaires séparent le sang maternel et fœtal.	Deux couches cellulaires séparent le sang maternel et fœtal.
Equidés - Cétacés Suidés - Pachydermes	Ruminants	Carnivores	Primates - Rongeurs Chiroptères - Insectivores

Tableau 1. Les différents types de placentation.

L'espèce **humaine** appartient à l'ordre des primates, classé dans le groupe des euthériens. La gestation est idéalement d'une durée de neuf mois. A terme, le placenta humain constitue un **disque** de 18 à 20 centimètres de diamètre, pesant environ 500 grammes (1/6<sup>ème</sup> du poids fœtal à la naissance). La placentation humaine est dite **hémochoriale**, les cellules placentaires envahissant profondément la paroi et les artères de l'utérus maternel.

L'appareil reproducteur féminin a donc évolué afin d'acquérir des propriétés diverses, permettant à l'ensemble des phases de gamétogénèse, fécondation, implantation et développement embryonnaires et gestation de se dérouler à l'intérieur de l'organisme maternel.

#### B. L'appareil reproducteur féminin

Il a longtemps été supposé que les embryons porteurs des chromosomes XX subissaient une « différenciation sexuelle féminine par défaut » en raison de l'absence du gène *SRY* (sex-determining region of Y chromosome) porté par le chromosome Y. Cependant au cours de ces dernières années, plusieurs études réalisées chez la souris ont démontré que les gènes *WNT4* (wingless-type MMTV integration site family member 4), *DAX1* (dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1), *RSPO1* (R-spondin 1) et *FOXL2* (forkhead box protein L2) sont des gènes clés de la différenciation de l'appareil reproducteur féminin (Kashimada and Koopman, 2010; Biason-Lauber, 2012). L'ensemble de ces gènes est impliqué dans l'ovogenèse et la folliculogenèse (Kashimada and Koopman, 2010). Ils induisent également, *via* la synthèse d'œstrogènes par les cellules ovariennes, la différenciation des voies génitales par le développement des canaux de Müller et la régression des canaux de Wolff. Ainsi comme chez l'homme, le déterminisme sexuel féminin est un processus génétiquement régulé. A sa naissance, la petite fille présente un système reproducteur se composant de deux gonades femelles (les **ovaires**) et de voies génitales formées par l'**utérus** et les **trompes de Fallope (Figure 2)**.



#### Figure 2. Déterminisme sexuel féminin.

Jusqu'à la sixième semaine de développement, les voies génitales sont identiques chez les embryons XX et XY. A partir de la septième semaine, la gonade XX expriment différents gènes induisant la différenciation de l'ovaire. Celui-ci est alors capable de sécréter des œstrogènes responsables de la régression des canaux de Wolff et de la différenciation des canaux de Müller en voies génitales (utérus (1) et trompes de Fallope (2)).

#### 1. Les ovaires

Les ovaires sont des glandes mixtes présentant une action **endocrine** (production d'œstrogènes et de progestérone) et **exocrine** (production de gamètes, les ovocytes). La région interne de l'organe appelée **médulla**, se compose de tissu conjonctif lâche richement vascularisé et innervé. Le **cortex** ovarien situé en périphérie est le lieu de développement des ovocytes. La **folliculogenèse** et l'**ovogenèse** se déroulent donc dans cette zone corticale de l'ovaire.

#### **\*** Fonction exocrine de l'ovaire

Au cours de la période intra-utérine et à partir de la différenciation de la gonade bipotentielle en ovaire, les cellules souches femelles appelées ovogonies apparaissent et se multiplient intensément. Lors du septième mois de développement fœtal, un stock d'ovogonies diploïdes entrent en méiose et se bloquent en prophase I, formant les **ovocytes primaires**. Ceux-ci s'entourent d'une couche unicellulaire de cellules épithéliales et constituent les **follicules primordiaux** considérés comme la « réserve ovarienne ». Certains follicules sont ensuite recrutés pour poursuivre leur développement. Les cellules épithéliales entourant l'ovocyte deviennent cubiques et caractérisent le **follicule primaire**. Puis, celles-ci prolifèrent formant un épithélium pluristratifié. Elles se différencient en deux populations cellulaires distinctes, les cellules de la granulosa et les cellules de la thèque. Une couche de glycoprotéines formant une zone pellucide autour de l'ovocyte se met également en place. Le **follicule secondaire** devient alors

réceptif aux gonadotrophines sécrétées par l'hypophyse. En effet, les cellules de la granulosa expriment le récepteur de la FSH (follicle stimulating hormone) alors que le récepteur de la LH (luteinizing hormone) est exprimé par les cellules de la thèque. A ce stade, l'ovocyte est toujours bloqué en prophase I (McGee and Hsueh, 2000; Fréour and Barrière, 2007; Lesourd, 2014) (**Figure 3**).

Dès la puberté, la sécrétion de FSH induit le recrutement d'un pool de follicules secondaires qui se développent en follicules tertiaires ou **follicules antraux**. Des lacunes apparaissent au sein des cellules de la granulosa. Celles-ci fusionnent et forment une cavité appelée antrum, remplie de liquide folliculaire. Puis, l'un des follicules est sélectionné pour l'ovulation (follicule dominant ou **follicule de De Graaf**) alors que les autres follicules tertiaires dégénèrent (McGee and Hsueh, 2000). L'ovocyte du follicule dominant reprend alors sa méiose et se bloque en métaphase II, formant un **ovocyte secondaire** apte à être ovulé (**Figure 3**).

Après la libération de l'ovocyte, les cellules de la granulosa et de la thèque du follicule ovulant subissent une réaction de lutéinisation induisant leur différenciation en cellules lutéales constituant le **corps jaune**. Si l'ovocyte n'est pas fécondé par un spermatozoïde, ce corps jaune dégénère (**Figure 3**).





Les follicules primordiaux (1) et les follicules primaires (2) constituent la « réserve ovarienne ». Suite à différents signaux paracrines, les cellules folliculaires entourant l'ovocyte se différencient en cellules de la granulosa (bleu) et cellules de la thèque (vert). Le follicule est alors dit secondaire (3) et devient réceptif aux gonadotrophines. Dès la puberté, la FSH induit le recrutement et la différenciation de follicules tertiaires (4) présentant une cavité remplie de liquide folliculaire. Un seul de ces follicules (follicule de De Graaf) sera sélectionné pour l'ovulation. Suite à la libération de l'ovocyte, les cellules de la granulosa et de la thèque se différencient en cellules lutéales (jaune) constituant le corps jaune (5). La phase de croissance des follicules est appelée « phase folliculaire » du cycle ovarien alors que la période de maintien du corps jaune constitue la « phase lutéale ».

#### **\*** Fonction endocrine de l'ovaire

Les cellules de la thèque deviennent réceptives à la LH dès le stade pré-antral de la phase folliculaire. Le nombre de récepteurs à la LH augmente ensuite progressivement avec le nombre de cellules. Cette hormone hypophysaire induit la stéroïdogénèse thécale et notamment la synthèse d'**androgènes** à partir du cholestérol. Dans le même temps, la FSH stimule l'activité de l'aromatase dans les cellules de la granulosa. Cette enzyme convertit les androgènes en **œstrogènes**. L'augmentation de la production d'œstrogènes par les cellules de la granulosa est responsable du pic de LH induisant la dissociation des cellules folliculaires et l'ovulation. Au cours de la phase lutéale, la LH stimule la production de **progestérone** (et plus faiblement d'œstrogènes) par les cellules du corps jaune (Lesourd, 2014).

#### 2. L'utérus

Au cours de l'ovulation, l'ampoule des trompes de Fallope (également appelées oviductes) se rapproche de l'ovaire. L'ovocyte est alors lentement libéré dans la trompe où a lieu l'éventuelle rencontre avec un spermatozoïde. La **fécondation** déclenche la fin de méiose de l'ovocyte secondaire. Le zygote formé subit ensuite une phase de développement au cours de laquelle des divisions cellulaires intenses aboutissent à la formation d'un embryon au stade **blastocyste**, considéré comme le stade de compétence embryonnaire (l'embryon est apte à s'implanter dans l'organisme maternel). Sept jours après la fécondation chez l'espèce humaine, le blastocyste atteint l'utérus.

L'utérus humain est un organe composé d'une cavité délimitée par une muqueuse (l'**endomètre**) qui repose sur une musculeuse (le **myomètre**). L'endomètre est impliqué dans les phénomènes d'implantation embryonnaire et participe au maintien de la gestation par de nombreuses fonctions. Le myomètre joue quant à lui un rôle important au cours de l'expulsion du nourrisson par des mécanismes de contractions musculaires lors de l'accouchement.

#### C. L'endomètre

L'endomètre est constitué d'un **épithélium simple et polarisé**. Il repose sur un **stroma** composé de tissu conjonctif et de cellules de soutien. On distingue classiquement deux couches endométriales (**Figure 4**). La **couche fonctionnelle** est la zone la plus externe de l'endomètre située au contact de la cavité utérine. Elle est sous l'influence directe de l'environnement hormonal et est ainsi régénérée de manière cyclique. En effet, sa structure et son épaisseur varient au cours du cycle menstruel et au cours de la vie de la femme (enfance, puberté, grossesse, ménopause). La **couche basale** subit quant à elle très peu de modifications. Cependant, elle joue un rôle essentiel dans la régénération des cellules de la couche superficielle à chaque nouveau cycle.



Couche fonctionnelle de l'endomètre Couche basale de l'endomètre

Myomètre

Figure 4. Coupe histologique transversale de l'utérus humain.

#### 1. Evolution de l'endomètre au cours du cycle menstruel

Le cycle menstruel est directement contrôlé par la production hormonale hypothalamo-hypophysaire (FSH et LH) et ovarienne (œstrogènes et progestérone). L'endomètre subit ainsi un renouvellement cyclique, alternant des phases de **régression**, **prolifération** et **différenciation**. Chez la femme, le cycle menstruel « idéal » est d'une durée de 28 jours. Cependant, des différences inter-individuelles et intraindividuelles sont fréquemment observées. En effet, une étude danoise réalisée chez près de 4000 femmes a montré que la durée des cycles menstruels varient entre 21 jours et 35 jours (seuls 1% des cycles sont en dehors de cet intervalle). Cependant, 19% des femmes ont connu au moins un cycle d'une durée inférieure à 21 jours au cours de l'étude. De la même manière, 30% d'entre elles ont présenté au minimum un cycle supérieur à 35 jours (Münster *et al.*, 1992).

#### ✤ <u>La phase menstruelle</u>

Le premier jour des menstruations initie le cycle menstruel. Elles durent généralement trois à six jours. En absence d'embryon dans la cavité utérine, le corps jaune reçoit différents signaux moléculaires induisant sa dégénérescence par apoptose (Tomac *et al.*, 2011). L'arrêt de la production hormonale par les cellules lutéales induit alors la régression du tissu endométrial. La chute brutale de progestérone et d'œstrogènes provoque la vasoconstriction des artères utérines et une **ischémie** locale des glandes endométriales. Celles-ci sécrètent alors des facteurs toxiques pour l'endothélium tels que la prostaglandine F2 qui induit un saignement. L'ischémie devient ensuite diffuse et induit la **nécrose** des cellules endométriales, responsable de l'amincissement, la régression et enfin l'atrophie de la couche superficielle de l'endomètre (Maybin and Critchley, 2015).

#### \* <u>La phase proliférative</u>

Egalement appelée phase régénérative, la phase proliférative s'étend de la fin des menstruations jusqu'à l'ovulation (qui a lieu le 14<sup>ème</sup> jour du cycle menstruel idéal). Elle a lieu sous l'action des œstrogènes sécrétés par les cellules de la granulosa au cours de la phase folliculaire du cycle ovarien. Suite à la liaison à leur récepteur spécifique ER (estrogen receptor), les œstrogènes exercent des effets génomiques et non-génomiques dans les cellules endométriales. Les effets génomiques sont observés suite à la fixation de la protéine ER sur une séquence ERE (estrogen-response element) située dans la région promotrice de nombreux gènes dépendant des œstrogènes, tels que les facteurs de transcription oncogènes c-myc et c-fos. Ceux-ci activent alors l'expression de différentes cyclines (cycline D1, B1, E) permettant la progression du cycle cellulaire et donc la prolifération (Gielen *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2016). Les œstrogènes stimulent également la transcription de gènes codant différents facteurs de croissance tels que l'IGF-1 (insulin-like growth factor-1), l'EGF (epidermal growth factor) et leurs récepteurs spécifiques dans l'endomètre (Kleinstein et al., 1993; Kashima et al., 2008). Enfin, les œstrogènes réalisent leurs effets non-génomiques suite à l'activation par phosphorylation de différentes voies de signalisation intracellulaires impliquées dans la prolifération cellulaire. Ces voies (MAPK et PI3K notamment) sont également activées par les facteurs de croissance IGF-1 et EGF (Gielen et al., 2007; Silva et al., 2016).

Ainsi, l'épithélium luminal se reconstruit et l'épithélium glandulaire forme des glandes qui restent rectilignes tout au long de la phase proliférative. La prolifération intense des cellules stromales induit l'épaississement de l'endomètre (10 à 12 mm à la fin de la phase proliférative) (Bromer *et al.*, 2009).

#### \* La phase sécrétoire

Il est bien établi que les œstrogènes induisent la transcription des récepteurs de la progestérone dans les cellules endométriales (Chen and Jow, 1989). Il est donc important que l'endomètre soit sous influence œstrogénique pour que la progestérone initie la phase sécrétoire. Cette phase a lieu après l'ovulation et perdure jusqu'à la fin du cycle. Contrairement aux œstrogènes, la progestérone inhibe la prolifération des cellules endométriales qui constituent le stroma utérin en inhibant l'expression des ER (Kurita et al., 1998). Cet arrêt de la croissance cellulaire permet aux cellules endométriales de s'engager dans un processus de différenciation cellulaire appelé décidualisation. Ce phénomène conduit à la formation de larges glandes tortueuses chargées de glycogène au sein de l'endomètre. A l'inverse, la progestérone stimule la prolifération des cellules endothéliales des artères utérines présentes dans la couche basale de l'endomètre. Cet effet est dû à l'augmentation de la production du facteur de croissance VEGF (vascular endothelial growth factor) par la progestérone. Les artères utérines se développent parallèlement aux glandes, et présentent d'importantes ramifications et spiralisations. Enfin, la progestérone induit l'expression de différentes chémokines nécessaires au recrutement des cellules immunitaires indispensables au phénomène d'immunotolérance maternelle (Park and Yang, 2011). La régulation du dialogue immunologique entre les cellules endométriales et les cellules placentaires sera développée dans la partie F de ce chapitre. De la même façon, les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le phénomène de maturation endométriale (réceptivité et décidualisation) seront décrits dans le

#### CHAPITRE 2.

L'endomètre est alors apte à accueillir un embryon au cours d'une courte période appelée « **fenêtre implantatoire** » comprise entre les jours 20 et 24 d'un cycle menstruel idéal de 28 jours. Cependant, la grande hétérogénéité de la durée du cycle a conduit les communautés scientifiques et médicales à revoir cette définition. Aujourd'hui, la fenêtre implantatoire est ainsi estimée entre les jours 6 et 12 suivant le pic de LH spécifique de l'ovulation (Wilcox *et al.*, 1999). Cette phase coïncide avec l'entrée de l'embryon compétent (stade blastocyste) dans la cavité utérine. L'implantation est mesurée par la sécrétion croissante de l'**hormone chorionique gonadotrope** (hCG) spécifiquement synthétisée par les cellules trophoblastiques de l'embryon. L'hCG assure le maintien du corps jaune et la synthèse de progestérone (Shah and Nagarajan, 2013). En absence d'embryon, le corps jaune régresse et la sécrétion de progestérone chute brutalement initiant les menstruations d'un nouveau cycle menstruel (**Figure 5**).



Figure 5. Régulation du cycle menstruel par les hormones ovariennes.

#### 2. Evolution de l'endomètre au cours de la vie de la femme

L'endomètre ne subit cette cyclicité hormonale qu'entre la puberté et la ménopause. En dehors de cette période d'activité ovarienne, l'endomètre de la petite fille, de la femme enceinte et de la femme ménopausée présente donc des caractéristiques propres à ces différentes périodes (Trévoux, 2009).

#### \* <u>L'endomètre fœtal</u>

Au cours de la période intra-utérine, le fœtus est sous influence des œstrogènes et de la progestérone sécrétés par la mère. De plus, la création de la réserve ovarienne induit une sécrétion œstrogénique par le fœtus. Enfin, le placenta lui-même synthétise de la progestérone et des œstrogènes. Ainsi, la structure de l'endomètre est influencée jusqu'à la naissance par cette production hormonale. Une étude effectuée chez des nouveau-nées a montré que 32% des endomètres étaient en phase proliférative et 68% d'entre eux avaient atteint le stade sécrétoire (Ober and Bernstein, 1955).

#### L'endomètre pré-pubère

Pendant l'enfance et jusqu'à la puberté, l'ovaire est en quiescence. La production hormonale (LH, FSH, œstrogènes, progestérone) est très faible. L'endomètre prend donc un aspect inactif, peu vascularisé et mince (son épaisseur est inférieure à 1 mm). A l'approche de la puberté, les premiers cycles ovariens anovulatoires se mettent en place donnant un aspect prolifératif à l'endomètre.

#### \* L'endomètre de la ménopause

A mesure que les cycles ovariens se raréfient ou deviennent incomplets, l'endomètre commence à s'amincir et devient hypotrophique. Sa structure se rapproche alors de l'endomètre pré-pubère avec un épithélium simple, des glandes rectilignes et un stroma peu riche en cellules.

#### \* L'endomètre gravide

La placentation hémochoriale se caractérise par la décidualisation de l'endomètre et la formation de la décidue. On distingue alors trois régions anatomiques distinctes. La *decidua basalis* correspond à la zone où s'infiltrent les cellules trophoblastiques de l'embryon. La *decidua capsularis* recouvre l'embryon suite à son encapsulation au cours de l'implantation. Enfin, la *decidua parietalis* comprend l'ensemble de l'endomètre hors du site d'implantation (**Figure 6**).

La *decidua basalis* est elle-même divisée en deux zones distinctes. En superficie, la *decidua spongiosa* est constituée de glandes non-sécrétrices et du stroma décidualisé. Elle repose sur la *decidua compacta* constituée des glandes sécrétrices et d'un stroma non-décidualisé. L'ensemble repose sur la couche basale de l'endomètre qui permet la régénération du tissu après l'accouchement.



Figure 6. Coupe sagittale schématique d'un utérus en début de gestation.

Modifié d'après Snell. 2008. Au cours de l'implantation embryonnaire, les cellules trophoblastiques se développent dans la décidue dans une zone appelée *decidua basalis*. Le développement de l'embryon conduit à la disparition progressive de la cavité utérine. La *decidua capsularis* et la *decidua parietalis* sont donc amenées à fusionner pour former la *decidua vera*.

La *decidua basalis* est la zone endométriale qui subit les nombreuses modifications associées à la grossesse. Ces modifications comprennent notamment le remodelage de la matrice extracellulaire et une transformation des vaisseaux sanguins qui permettront de former le réseau utéroplacentaire. L'ensemble de ces modifications sera détaillé dans le **CHAPITRE 2**.

#### D. L'implantation embryonnaire

Au cours de la folliculogenèse, une couche acellulaire appelée **zone pellucide** se forme entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa environnantes. Elle correspond à l'assemblage de différentes glycoprotéines appelées ZP (zona proteins). La zone pellucide entourant l'ovocyte humain est composée de quatre types de glycoprotéines différents (Gupta, 2015). Celles-ci jouent un rôle important au cours de la **fécondation** en favorisant la fixation du spermatozoïde à l'ovocyte. ZP1, ZP3 et ZP4 induisent alors la **réaction acrosomique**. Le déversement du contenu acrosomique réorganise la zone pellucide permettant au spermatozoïde d'atteindre l'ovocyte. Cette réaction induit également la modification des protéines ZP qui deviennent inaptes à fixer un nouveau spermatozoïde. Le clivage de ZP2 semble être un mécanisme indispensable pour éviter la polyspermie qui serait délétère pour l'embryon (Wassarman *et al.*, 1999; Gupta, 2015).

Après la fécondation, les premières divisions cellulaires s'effectuent dans l'oviducte. L'embryon est toujours entouré de la zone pellucide. Celle-ci empêche la mise en place de contacts cellulaires entre l'embryon et les cellules des trompes évitant ainsi une **grossesse ectopique** (également appelée grossesse extra-utérine) (Gilbert, 2000).

Le septième jour post-fécondation, l'embryon a atteint le stade blastocyste et entre dans la cavité utérine. Il se caractérise par la fine couche cellulaire externe qui l'entoure : le **trophoblaste**. Celle-ci délimite une cavité (le **blastocèle**) au sein de laquelle repose une **masse cellulaire interne** à l'origine de la différenciation de l'embryon. La présence de pompes sodium-potassium (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase) dans les cellules trophoblastiques stimule l'entrée d'ions Na<sup>+</sup> responsables de l'accumulation d'eau dans le blastocèle par un mécanisme d'osmose. Cela induit l'expansion du blastocyste et l'amincissement de la zone pellucide. Les cellules du trophoblaste sécrètent alors une protéase appelée **strypsine** qui rompt la couche glycoprotéique permettant la sortie du blastocyste au cours du processus d'**éclosion** (Gilbert, 2000) (**Figure 7**). L'embryon peut alors s'implanter dans l'endomètre maternel.



Figure 7. Eclosion d'un blastocyste in vitro.

A. Le septième jour après la fécondation, les cellules embryonnaires se compactent et forme la masse cellulaire interne (MCI). Le blastocyste est toujours entouré par la zone pellucide (Z) et commence sa phase d'expansion. B. Suite à l'amincissement de la zone pellucide et à sa dégradation, l'éclosion du blastocyste a lieu. C. Le blastocyste est alors totalement apte à s'implanter. Il présente une assise cellulaire externe, le trophoblaste (T) délimitant le blastocèle (B) où repose la MCI qui se différenciera au cours de l'embryogenèse.

#### 1. Apposition et adhésion du blastocyste

Suite à son éclosion, le blastocyste entre en contact avec la paroi de l'utérus maternel. Si celui-ci a atteint un état de réceptivité, alors l'implantation embryonnaire peut avoir lieu. La première phase de l'implantation correspond à l'**apposition** du blastocyste à l'épithélium endométrial. Elle débute par l'orientation du blastocyste qui place son pôle embryonnaire (constitué de la masse cellulaire interne) au contact des cellules épithéliales de l'endomètre. La présence de pinopodes à l'extrémité apicale des cellules maternelles facilite la création d'interactions avec les cellules trophoblastiques. Ces pinopodes (projections cytoplasmiques) sont spécifiques de la fenêtre implantatoire et apparaissent sous l'action de la progestérone (Sharma and Kumar, 2012). L'apposition des cellules trophoblastiques aux cellules épithéliales maternelles est permise par la disparition de protéines formant le glycocalyx endométrial, notamment les mucines 1 et 16 (MUC-1 et MUC-16) (Aplin and Ruane, 2017).

Les premiers contacts entre l'embryon et l'endomètre sont ensuite renforcés au cours de la phase d'**adhésion** (ou adhérence). Bien que les mécanismes restent relativement peu connus chez l'espèce humaine, elle semble être initiée par les protéines LIF (leukemia inhibitory factor), IL-1 (interleukine-1) et HB-EGF (heparin binding-epithelial growth factor) exprimés à la fois dans les cellules trophoblastiques et les cellules maternelles. Leurs récepteurs sont eux aussi exprimés au sein des deux types cellulaires. La liaison de ces ligands induit alors l'expression de différentes molécules d'adhésion cellulaire (intégrines, cadhérines, séléctines) et de récepteurs membranaires (CD9, CD44 et CD55) dans les deux acteurs de l'implantation, créant ainsi de nouvelles interactions. D'autres protéines issues de la matrice extracellulaire (fibronectine, laminine, ostéopontine, trophinine, tastine) accentuent ces interactions (Simón *et al.*, 1998; Merviel *et al.*, 2001; Aplin and Kimber, 2004; Harada *et al.*, 2007; Singh and Aplin, 2009; Zhang *et al.*, 2013a; Aplin and Ruane, 2017).

#### 2. Invasion trophoblastique

Les interactions moléculaires qui se mettent en place entre le blastocyste et l'endomètre créent un stimulus **prolifératif** au sein des cellules trophoblastiques. A l'inverse, ces interactions induisent *via* l'activation de la protéine kinase C, l'**apoptose** des cellules épithéliales endométriales (Aplin and Ruane, 2017). Enfin, au cours de l'implantation embryonnaire, le blastocyste induit la dissociation des cellules endométriales en détruisant les **jonctions intercellulaires** (desmosomes) au sein de l'épithélium utérin (Preston *et al.*, 2006). L'ensemble de ces mécanismes favorisent l'infiltration des cellules trophoblastiques au sein du stroma endométrial au cours d'un processus appelé « **nidation** » (**Figure 8**).

A ce stade, le trophoblaste primitif se différencie en deux populations cellulaires distinctes : le **cytotrophoblaste** formé de cellules mononucléées périphériques et le **syncytiotrophoblaste** qui se développe au point d'ancrage de l'embryon à l'endomètre. Ce syncytium possède une activité protéolytique importante qui permet la pénétration de l'embryon au sein du stroma utérin, jusqu'à son enfouissement complet, le neuvième jour après la fécondation (**Figure 8**).



Figure 8. L'implantation embryonnaire humaine.

Modifié d'après Fitzgerald *et al.* 2008. L'implantation a lieu lorsqu'un embryon compétent (blastocyste) rencontre un endomètre réceptif. Elle débute par l'apposition puis l'adhésion des cellules trophoblastiques aux cellules épithéliales utérines, grâce à différentes molécules d'adhérence. Puis, le trophoblaste envahit l'endomètre, suite à la différenciation d'une masse syncytiale aux propriétés protéolytiques : le syncytiotrophoblaste.

#### E. Le développement placentaire

#### 1. Formation de la villosité choriale

A l'issue de la nidation, des vacuoles apparaissent au sein de la masse syncytiale. Elles se développent progressivement pour former de véritables lacunes. En parallèle, les cellules du cytotrophoblaste prolifèrent et envahissent les travées du syncytiotrophoblaste, formant les **villosités choriales primaires**. Puis, la prolifération de cellules mésenchymateuses d'origine embryonnaire au sein du cytotrophoblaste induit la formation des **villosités choriales secondaires** qui se développent et s'arborisent. Enfin, suite à une angiogenèse intense, les premiers vaisseaux sanguins fœtaux apparaissent au sein des **villosités choriales tertiaires**. Trois semaines après la fécondation, le réseau vasculaire fœtal relie les vaisseaux placentaires. La villosité choriale, unité structurale et fonctionnelle du placenta, a

alors acquis sa structure définitive. Les lacunes sont désormais appelées chambres intervilleuses. La **chambre intervilleuse** est à ce stade remplie de sécrétions endométriales. Elle sera, à partir de la onzième semaine de grossesse, irriguée progressivement par le sang maternel qui apporte les nutriments nécessaires à la croissance du fœtus. La villosité choriale est qualifiée de **villosité flottante** lorsqu'elle est libre dans la chambre intervilleuse. Elle peut également s'ancrer dans l'endomètre et être qualifiée de **villosité crampon**. Les villosités définitives sont constituées de deux types cellulaires distincts : la lignée villeuse et la lignée extravilleuse (Evain-Brion and Malassiné, 2011) (**Figure 9**).



Figure 9. Développement et structure définitive de la villosité choriale.

Modifié d'après Evain-Brion *et al.* 2011. A. Neuf jours après la fécondation, des lacunes se sont formées au sein du syncytiotrophoblaste. B. Le cytotrophoblaste envahit le syncytiotrophoblaste. C. Les cellules mésenchymateuses prolifèrent et colonisent la villosité. D. L'angiogenèse induit la formation de vaisseaux fœtaux. E. Schéma d'une villosité choriale fonctionnelle en coupe longitudinale.

#### 2. La lignée villeuse

Au cours de la formation de la villosité choriale, la mise en place de l'axe mésenchymateux repousse le cytotrophoblaste et le syncytiotrophoblaste en périphérie du réseau villositaire, les plaçant au contact de la chambre intervilleuse, formant ainsi l'épithélium trophoblastique villeux (Evain-Brion and Malassiné, 2011) (Figure 9).

La fonction principale du syncytiotrophoblaste est d'assurer les **échanges** entre la mère et l'embryon. A la manière des cellules intestinales, les cellules villeuses présentent une membrane microvillositaire qui facilite la mise en place de ces échanges. De nombreux systèmes de transport (système d'endocytose, transport actif, transport passif, transport facilité) permettent l'entrée d'une grande diversité de molécules au sein de la villosité choriale. Le syncytiotrophoblaste possède également un **rôle endocrine** indispensable à l'adaptation de l'organisme maternel à l'état de grossesse, au maintien de la gestation, à la croissance et au développement du fœtus, ainsi qu'au déclenchement de l'accouchement. L'ensemble de ces fonctions sera détaillée dans la dernière partie de ce chapitre.

Tout au long de la grossesse, le syncytiotrophoblaste est renouvelé par un mécanisme de fusion cellulaire des cytotrophoblastes villeux sous-jacents. La formation de ce syncytium se traduit par une **différenciation morphologique** (agrégation et fusion des cytotrophoblastes villeux) accompagnée d'une **différenciation fonctionnelle** (activation de gènes codant différentes hormones) (**Figure 10**).

La phase de différenciation débute par un mécanisme d'agrégation des cytotrophoblastes villeux. Les protéines impliquées dans la mise en place de jonctions intercellulaires, notamment la **E-cadhérine** et leurs protéines associées (les **caténines**  $\alpha$  et  $\beta$ ) semblent être indispensables à ce processus (Getsios and MacCalman, 2003). Un changement de profil d'expression des protéines de jonction est ensuite observé, conduisant à la disparition du complexe E-cadhérine/caténines et à l'apparition des protéines de fusion.

Au cours de la phase de fusion, la **cadhérine-11** et la **connexine-43** jouent un rôle déterminant lors de la formation de cellules polynucléées. En effet, il a été démontré que leur invalidation perturbe fortement ce processus. La protéine ZO-1 (**zonula occludens-1**) en s'associant à la connexine-43 joue également un rôle fondamental au cours de la syncytialisation (Getsios and MacCalman, 2003; Frendo, 2008). Enfín, le rôle des **syncytines** 1 et 2 dont l'expression augmente au cours de la fusion cellulaire a été clairement établi (Malassiné and Cronier, 2002; Frendo, 2008). Les syncytines sont des protéines initialement présentes dans l'enveloppe des virus. Elles sont essentielles lors de la fusion de la membrane virale avec la membrane plasmique de la cellule hôte. Leurs gènes ont ainsi été intégrés au génome humain (Dupressoir and Heidmann, 2011).


#### Figure 10. Formation du syncytiotrophoblaste.

Modifié d'après Merviel *et al.* 2001. La formation du syncytiotrophoblaste débute par l'agrégation de cytotrophoblastes villeux, suite à l'expression de protéines de jonctions cellulaires. Puis, les protéines de fusion prennent le relais et induisent la syncytialisation. Le syncytiotrophoblaste est alors fonctionnel et présente une fonction endocrine importante.

Au cours de ce processus de fusion, la fonction endocrine se met en place (Huckle, 2017). Le syncytiotrophoblaste sécrète alors de nombreux facteurs (hormones polypeptidiques, hormones stéroïdes, neuropeptides, facteurs de croissance, enzymes). Ces différents facteurs seront décrits dans la dernière partie de ce chapitre.

### 3. La lignée extravilleuse

A la base de la villosité crampon, au contact avec les cellules endométriales, les cytotrophoblastes perdent peu à peu leur potentiel prolifératif et acquièrent un phénotype invasif leur permettant de coloniser profondément le stroma utérin et de migrer jusqu'au myomètre. Ils forment ainsi la population de **cytotrophoblastes extravilleux** (CTEV) qui assure l'ancrage du placenta à l'endomètre. La phase invasive se termine par la différenciation finale des CTEV en **cellules géantes** binucléées dont les mécanismes de formation restent énigmatiques à ce jour. L'apparition de ces cellules pourrait être induite par la fusion de plusieurs CTEV ou suite à une mitose incomplète (échec de la phase de cytocinèse). De la même façon, la fonction des cellules géantes est peu connue. Cependant, la synthèse d'hormones spécifiques de la grossesse a été observée dans ce type cellulaire (al Lamki *et al.*, 1999). Enfin, il a été suggéré que leur apparition permet d'éviter une migration excessive des CTEV dans l'endomètre (Velicky *et al.*, 2016).

Certains CTEV orientent leur invasion vers les artères utérines et les colonisent, formant les **cytotrophoblastes endovasculaires**. Ces cellules acquièrent peu à peu les propriétés des cellules endothéliales et contrôlent l'influx sanguin vers le placenta tout au long de la grossesse (**Figure 9**).

L'acquisition du phénotype invasif par les CTEV consiste en une réorganisation du profil d'expression des protéines membranaires régulant les interactions cellule-cellule (les **cadhérines**) et les interactions cellule-matrice extracellulaire endométriale (les **intégrines**).

Les cytotrophoblastes prolifératifs situés à la base de la villosité crampon présentent un profil d'expression des cadhérines identique à celui des cytotrophoblastes villeux. En effet, ils possèdent un aspect épithélial et expriment la **E-cadhérine** et la **cadhérine-11**. Ces protéines favorisent les interactions trophoblaste-trophoblaste et trophoblaste-endomètre. Lors de l'invasion, ces cadhérines disparaissent, rompant les liaisons intercellulaires. Les cytotrophoblastes extravilleux invasifs expriment alors la **cadhérine-6**. Enfin, l'orientation du processus invasif vers les artères utérines nécessite l'expression de la **VE-cadhérine** spécifique des cellules endothéliales (MacCalman *et al.*, 1998; Harris *et al.*, 2009).

Cette modification d'expression des cadhérines est associée à un remaniement complet du répertoire des intégrines. Les intégrines sont des glycoprotéines de surface permettant la liaison de la cellule aux différents constituants de la matrice extracellulaire. La matrice extracellulaire de la décidue ne présentant pas une composition uniforme, les CTEV réorganisent en permanence l'expression des intégrines à leur surface. Ainsi, les cytotrophoblastes prolifératifs expriment l'**intégrine a6β4** liant la laminine. Puis, dans une MEC enrichie en fibronectine, les CTEV invasifs expriment les **intégrines a1β1** et **a6β1** apparaissent. Les cytotrophoblastes endovasculaires expriment quant à eux, les **intégrines avβ3** et **a4β1** qui se lient aux molécules d'adhésion présentes à la surface de l'endothélium (Harris *et al.*, 2009) (**Figure 11**).



#### Figure 11. Acquisition d'un phénotype invasif par les cytotrophoblastes extravilleux.

Au cours du processus invasif, les cytotrophoblastes extravilleux subissent une modification de leur phénotype, associée à une réorganisation complète du profil d'expression des intégrines et des cadhérines.

# F. L'immunologie de la grossesse

Chez les mammifères euthériens, la grossesse constitue un véritable **paradoxe immunologique**. Les cellules trophoblastiques d'origine embryonnaire seraient normalement reconnues par le système immunitaire maternel comme « *non-soi* » et détruites. L'implantation est comparée à une greffe semi-allogénique. En effet, les cellules trophoblastiques de l'embryon héritent à 50% du patrimoine génétique paternel. Dans certains cas, elle est même totalement allogénique, notamment lorsque la mère a recours au don d'ovocytes. Dans les années 1950, il fut suggéré que l'endomètre et le placenta constituaient des tissus immunologiquement neutres permettant le déroulement de la grossesse. Cette hypothèse a été infirmée par de nombreuses découvertes qui ont mis en évidence que l'interface fœto-maternelle est en réalité un lieu où les mécanismes immunitaires sont très actifs (Merviel *et al.*, 2001; Trévoux, 2009; Evain-Brion and Malassiné, 2011).

## 1. L'immunotolérance de l'endomètre

Au cours de la phase proliférative du cycle menstruel, le maintien de l'intégrité de la muqueuse utérine est assuré par les cellules immunitaires appartenant à l'**immunité adaptative**. Il s'agit notamment de lymphocytes B et de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Lédée *et al.*, 2014). Après l'ovulation, la progestérone induit l'accumulation d'AMP cyclique dans les cellules endométriales stromales et épithéliales. Ce second messager active de nombreux gènes cibles codant pour des interleukines aux propriétés

chémoattractantes telles que IL-1, IL-6, IL-8 et IL-11. Ces interleukines assurent le recrutement de nombreuses cellules immunitaires appartenant à l'**immunité innée** (Lédée *et al.*, 2014; Vinketova *et al.*, 2016). Ainsi, au moment de la fenêtre implantatoire, un « **switch immunitaire** » entre l'immunité adaptative et l'immunité innée est observé (Lédée *et al.*, 2014).

Ces évènements immunologiques sont indispensables et assurent le bon déroulement de l'implantation embryonnaire. Ainsi, une migration anormale des cellules immunitaires pourrait vraisemblablement être à l'origine d'un arrêt précoce de la gestation (Lédée *et al.*, 2014). On parle de **suractivation endométriale** lorsque les cellules immunitaires sont recrutées en masse, induisant une production cytokinique démesurée. Ce phénomène perturberait fortement la réponse immunotolérante de l'endomètre vis-à-vis de l'embryon. La suractivation endométriale serait à l'origine de (i) la mort de l'embryon reconnu comme étranger et (ii) de la destruction de la muqueuse utérine par un phénomène d'apoptose. A l'inverse, lorsque les cellules immunitaires sont recrutées de manière insuffisante dans l'endomètre, il s'agit d'une **sous-activation endométriale**. Cela se traduit par une production de cytokines très faible, à l'origine de la non-adhésion de l'embryon à l'épithélium utérin (Lédée *et al.*, 2014).

Lors de la fenêtre implantatoire, l'environnement immunitaire de l'endomètre est composé de **cellules utérines natural killers** (70%), de **macrophages CD14**<sup>+</sup> (20%), de **lymphocytes T auxiliaires CD4**<sup>+</sup> (10%) et de **cellules dendritiques** (1%) (Le Bouteiller and Tabiasco, 2006).

# ✤ Les cellules utérines natural killers (uNK)

Les cellules NK présentes dans le sang périphérique possèdent des récepteurs membranaires leur permettant d'interagir avec différents ligands exprimés par des cellules « anormales » (cellules infectées ou cellules tumorales). L'activation de ces récepteurs à la surface des cellules NK induit la libération de molécules cytotoxiques (perforine et granzymes) conduisant à la mort de la cellule cible. Cependant, les cellules uNK se distinguent des cellules NK périphériques par le profil spécifique d'expression de leurs récepteurs membranaires qui leur confère un potentiel cytotoxique atténué. En effet, les cellules uNK se lient aux cellules trophoblastiques mais se révèlent incapables de créer une synapse avec ces cellules, empêchant la libération des molécules cytotoxiques. Ce phénomène est contrôlé par des molécules

• 38 •

inhibitrices telles que le TGF- $\beta$  (transforming growth factor beta) et le VEGF qui sont produites par les macrophages, les lymphocytes T régulateurs, les cellules endométriales et les cellules trophoblastiques (Le Bouteiller and Tabiasco, 2006; Hanssens *et al.*, 2012).

Les cellules uNK sécrètent de nombreuses cytokines impliquées dans les phases de recrutement des macrophages et des cellules dendritiques mais aussi dans l'activation des lymphocytes T auxiliaires (Le Bouteiller and Tabiasco, 2006; Hanssens *et al.*, 2012). En outre, les cellules uNK semblent jouer un **rôle immunotrophique** important. En effet, elles produisent de nombreuses cytokines intervenant dans les mécanismes de décidualisation et de contrôle de l'invasion trophoblastique. Il s'agit plus précisément des cytokines IL-1 et LIF (leukemia inhibitory factor) (Lédée-Bataille *et al.*, 2001). Les cellules uNK joueraient également un rôle majeur au cours de l'angiogenèse et lors du remodelage du réseau vasculaire utérin par la production de cytokines angiogéniques telles que l'angiopoïétine 2, le VEGF (vascular endothelial growth factor) et le PIGF (placental growth factor) (Evain-Brion and Malassiné, 2011; Zhang *et al.*, 2011). Il est clairement établi que certaines cytokines produites par les cellules uNK à l'interface fœto-maternelle participent à la croissance placentaire. Par exemple, les protéines IL-3 et GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor) agissent comme des facteurs de croissance activant des oncogènes à l'origine de la prolifération cellulaire (Lédée-Bataille *et al.*, 2001).

## \* Les lymphocytes T

Les lymphocytes T auxiliaires ou « *helpers* » (LTh) qui atteignent la décidue se différencient en quatre populations cellulaires distinctes en fonction des signaux émis par les cellules uNK, les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules endométriales et les cellules trophoblastiques. La production de molécules pro-inflammatoires (IL-6, IL-12 et interféron γ) favorise la différenciation des lymphocytes **Th1** et **Th17**. A l'inverse, un environnement anti-inflammatoire (IL-4 et IL-10) oriente les lymphocytes vers la voie **Th2**. Les lymphocytes Th1 et Th17 induisent par la suite une réponse inflammatoire alors que les lymphocytes Th2 possèdent une action anti-inflammatoire. Les cellules déciduales, les cellules trophoblastiques et les cellules immunitaires orientent leur production cytokinique vers la voie Th2 induisant ainsi le phénomène de tolérance de l'embryon par l'endomètre (Hanssens *et al.*, 2012).

Sous l'action du TGF- $\beta$  produit par les cellules endométriales et immunitaires, certains lymphocytes se différencient en cellules T régulatrices (**Treg**). Plus précisément, les Treg diminuent la prolifération et la cytotoxicité des lymphocytes Th1, Th17 et des cellules uNK. Ils sécrètent eux-mêmes des molécules immunosuppressives telles que le TGF- $\beta$  et l'IL-10 (Hanssens *et al.*, 2012).

### \* Les macrophages

De la même manière que les lymphocytes T auxiliaires, la différenciation des macrophages déciduaux est soumise à l'environnement endométrial. Un environnement Th1 active la voie **M1 défensive** et la libération de cytokines pro-inflammatoires. A l'inverse, les cytokines de la voie Th2 orientent les macrophages vers la différenciation **M2 tolérante**. Ces derniers sécrètent des molécules immunosuppressives et participent au nettoyage des débris cellulaires et des cellules apoptotiques, au remodelage tissulaire et à l'angiogenèse. Les cellules uNK, les cellules endométriales et les cellules trophoblastiques orientent les macrophages vers la différenciation M2 (Hanssens *et al.*, 2012).

### ✤ <u>Les cellules dendritiques</u>

Dans la décidue, les cellules dendritiques sont maintenues dans un état immature par les cellules stromales et les cellules trophoblastiques *via* la production de la protéine MIC-1 (macrophage inhibitory cytokine-1). Les cellules dendritiques produisent de grandes quantités de TGF- $\beta$  favorisant la différenciation des lymphocytes Treg. Elles stimulent également la production de cytokines antiinflammatoires de la voie Th2 (TGF- $\beta$ , IL-4, IL-10, IL-13). De plus, en se fixant aux cellules trophoblastiques, les cellules dendritiques sécrètent l'IL-27 considérée comme une protéine tolérogène (Hanssens *et al.*, 2012).

## 2. L'antigénicité du trophoblaste

Au cours de la grossesse, l'embryon est « accepté » par l'endomètre suite à la mise en place d'une tolérance immunologique. Comme décrit précédemment, les cellules trophoblastiques participent directement à la mise en place de cette immunotolérance maternelle, en sécrétant de nombreuses molécules qui contrôlent le microenvironnement endométrial (**Figure 12**).

• 40 •

Ces mécanismes sont renforcés par une **diminution de l'antigénicité du trophoblaste** qui module l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) à sa surface. Le CMH (également appelé HLA pour *human leucocyte antigen*) est un système permettant la discrimination du « *soi* » et du « *nonsoi* » par les cellules immunitaires. Le HLA de classe 1 est reconnu par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et les cellules NK. Le HLA de classe 2 est fixé par les lymphocytes B et les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.

Les molécules HLA de la classe 2 et les isoformes classiques de la classe 1 (HLA-A et HLA-B) ne sont pas exprimées à la surface des cellules trophoblastiques. Ainsi, le trophoblaste est protégé de la cytotoxicité des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et des lymphocytes B (Le Bouteiller and Tabiasco, 2006; Hanssens *et al.*, 2012). En revanche, le trophoblaste exprime spécifiquement l'isoforme **HLA-C** qui les protège de l'action cytotoxique des cellules uNK de l'endomètre (Le Bouteiller and Tabiasco, 2006). De plus, les molécules **HLA-E**, **HLA-F** et **HLA-G** contribuent à la reconnaissance des cellules trophoblastiques par les cellules immunitaires maternelles comme appartenant au « *soi* » (Hanssens *et al.*, 2012). Enfin, l'antigène HLA-G induit l'apoptose des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ce qui expliquerait la faible représentation de ce type cellulaire dans la décidue (Le Bouteiller and Tabiasco, 2006; Evain-Brion and Malassiné, 2011). Les molécules HLA-C, HLA-E et HLA-G participent également à l'inactivation des cellules uNK et déclenchent la réponse tolérogène par les cellules dendritiques (Merviel *et al.*, 2001; Hanssens *et al.*, 2012).



Figure 12. Ensemble des évènements conduisant à l'immunotolérance maternelle.

# G. Structure de l'unité fœto-maternelle

Trois semaines après la fécondation, la villosité choriale présente sa structure définitive fonctionnelle. Le réseau vasculaire placentaire est mis en place dès le 23<sup>ème</sup> jour post-fécondation, faisant apparaître les premiers battements cardiaques. Lors de la quatrième semaine, le cordon ombilical se forme. Il est constitué d'une artère ombilicale reliant le système cardiaque de l'embryon au réseau villositaire du placenta et de deux veines transportant le sang riche en oxygène et les nutriments du placenta vers l'embryon (**Figure 13**).

Tout au long de la grossesse, la **circulation sanguine maternelle** et la **circulation embryo-placentaire** restent séparées. Après le remodelage des artères spiralées utérines par les cytotrophoblastes extravilleux, le sang maternel pénètre dans la chambre intervilleuse. Seules les cellules trophoblastiques constituant la villosité sont au contact du sang maternel, on parle donc de **placentation hémochoriale**.



**Figure 13. Organisation de la circulation sanguine de la placentation humaine hémochoriale.** A. Anatomie de la femme enceinte au cours du troisième trimestre de grossesse. B. Structure de l'unité fœtomaternelle. Les réseaux sanguins maternels et placentaires restent distincts. La placentation est dite hémochoriale. Le sang maternel provenant des artères utérines et remplissant la chambre intervilleuse entre en contact avec l'épithélium villeux de la villosité choriale.

## 1. Particularités du placenta de premier trimestre

Le placenta humain présente l'originalité de ne véritablement devenir un placenta hémochorial qu'à partir du second trimestre de grossesse. Au cours du processus invasif, certains cytotrophoblastes extravilleux orientent leur migration vers les artères utérines et s'organisent en « **bouchons** 

• 42 •

**trophoblastiques** » qui obstruent l'ouverture des vaisseaux et empêchent l'entrée du sang maternel dans la chambre intervilleuse. Une étude récente a démontré que ces bouchons perdurent jusqu'à la onzième semaine de gestation (Weiss *et al.*, 2016). Ce mécanisme permet d'établir un **environnement hypoxique** essentiel au cours de la grossesse physiologique précoce.

L'hypoxie se révèle très importante au cours de l'**angiogenèse placentaire**. En effet, de faibles teneurs en oxygène stimulent la production de différents facteurs tels que VEGF, PIGF (placental growth factor), Ets-1 (E26 transformation specific oncogene homolog-1) et KLF8 (Krüppel-like factor 8) nécessaires à la mise en place du réseau sanguin embryo-placentaire (Foidart *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2015). L'hypoxie induit également des modifications post-traductionnelles stabilisant la protéine HIF-1 (hypoxia inducible factor-1) et active l'expression du TGF- $\beta$ . Ces facteurs stimulent la prolifération des cellules trophoblastiques villeuses et extravilleuses. Ces effets prolifératifs limitent la syncytialisation et l'invasion cellulaire au profit du **développement de la surface placentaire** (Genbacev, 1997; Hu *et al.*, 2007). Cependant, ces effets anti-différenciants et anti-invasifs ne sont observés qu'à partir de la septième semaine de grossesse. L'hypoxie ne perturbe donc pas la mise en place des différentes lignées cellulaires constituant la villosité choriale (Genbacev *et al.*, 1996).

Enfin, l'hypoxie limite la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) délétères au cours des phases d'embryogenèse et d'organogenèse. L'hypoxie exerce ainsi une fonction **protectrice de l'embryon** en assurant un développement normal de l'unité embryo-placentaire (Lunghi *et al.*, 2007; Webster and Abela, 2007).

## 2. Mise en place de la placentation hémochoriale

Au cours des premiers stades de la grossesse, les artères utérines subissent un important **remodelage** dirigé par les cellules déciduales et les cellules immunitaires de l'endomètre (notamment les cellules uNK). Ces cellules produisent de nombreuses molécules pro-apoptotiques telles que l'interféron  $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha) qui induisent la mort des cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire. Elles sécrètent également des métalloprotéases (MMP-7 et MMP-9) qui digèrent la matrice extracellulaire endothéliale. Cette digestion diminue la cohésion cellulaire et induit l'apoptose des

• 43 •

cellules endothéliales (Whitley and Cartwright, 2010; Evain-Brion and Malassiné, 2011). Ce remodelage est renforcé par les CTEV constituant les bouchons trophoblastiques, qui sécrètent spécifiquement la MMP-12. L'activité de cette enzyme désorganise également la matrice extracellulaire endothéliale. De plus, les CTEV induisent l'apoptose des cellules endothéliales en stimulant la sécrétion du Fas-ligand et du TNF- $\alpha$  (Whitley and Cartwright, 2010; Evain-Brion and Malassiné, 2011).

Les CTEV constituant les bouchons trophoblastiques migrent alors le long de l'artère utérine et colonisent l'endothélium (Trévoux, 2009). Ainsi, dès la fin du premier trimestre (généralement entre la 10<sup>ème</sup> et la 12<sup>ème</sup> semaine de grossesse) les bouchons trophoblastiques se désagrègent. Ce mécanisme permet l'entrée du sang maternel dans la chambre intervilleuse. Dès cet instant, les villosités se développent en **situation normoxique**, la **placentation hémochoriale** apparaît. L'oxygène stimule alors l'invasion trophoblastique. Des cytotrophoblastes quittent le stade prolifératif, se différencient en CTEV endovasculaires et colonisent à leur tour les artères utérines (Genbacev, 1997; Challier and Uzan, 2003; Trévoux, 2009; Whitley and Cartwright, 2010). Enfin, les cellules déciduales sécrètent des substances vasodilatatrices telles que l'oxyde nitrique (NO) et le monoxyde de carbone (CO) qui augmentent le volume artériel et l'**influx sanguin** vers la chambre intervilleuse (Evain-Brion and Malassiné, 2011) (**Figure 14**).





cellules déciduales sécrètent des substances vasodilatatrices augmentant l'influx sanguin vers la chambre intervilleuse.

# H. Rôles de l'endomètre dans l'unité fœto-maternelle

La fonction principale de l'endomètre au cours de la gestation est d'assurer l'**ancrage du placenta**. Au cours du premier trimestre de grossesse, lorsque le sang maternel ne remplit pas encore la chambre intervilleuse, l'endomètre contribue également à la **fonction nutritive** de l'embryon. Enfin, il présente une **fonction paracrine** voire endocrine, importante.

## 1. L'endomètre : un tissu d'ancrage

La pénétration des cellules trophoblastiques dans l'endomètre au cours de l'implantation embryonnaire humaine représente l'une des formes les plus invasives du règne animal. Le stroma utérin se laisse envahir si profondément qu'il est capable de reconstituer son épithélium au-dessus du site d'implantation. On parle d'**invasion interstitielle**. En dehors de l'espèce humaine, ce type d'invasion est retrouvé chez de rares espèces, comme le chimpanzé ou le cobaye (Johnson and Everitt, 2002). Ce mécanisme nécessite une adaptation de l'endomètre en deux temps. Tout d'abord, sous l'influence de la progestérone, l'endomètre se réorganise pour faciliter l'invasion trophoblastique et l'ancrage du placenta. Il s'agit de la **décidualisation primaire**. Puis, une fois la phase invasive amorcée, la décidue contrôle l'invasion trophoblastique par divers phénomènes cellulaires et moléculaires intervenant au cours de la **décidualisation secondaire** (Merviel *et al.*, 2001; Kierszenbaum, 2006).

### ✤ <u>La réaction déciduale primaire facilite la nidation</u>

Chez l'espèce humaine, contrairement à d'autres espèces comme la souris, la réaction déciduale primaire a lieu à chaque cycle menstruel et n'est pas dépendante de l'embryon. Elle correspond à la différenciation des cellules stromales de l'endomètre en **cellules déciduales** sous l'influence de la progestérone ovarienne et concerne l'ensemble de l'endomètre. On parle de **décidualisation complète**. Les cellules déciduales sont structurellement et morphologiquement très différentes des cellules stromales. Ce sont de larges cellules hypertrophiées qui présentent un appareil de Golgi et un réticulum endoplasmique très développés, nécessaires à la formation des protéines constituant la matrice

• 45 •

extracellulaire. Les cellules déciduales composant le stroma utérin produisent ainsi la **laminine**, la **fibronectine**, le **collagène de type IV** et certains **protéoglycanes**, notamment l'héparane-sulfate (Benirschke *et al.*, 2012). De manière intéressante, une étude a mis en évidence que la structure de la matrice extracellulaire ne présente pas de laminine, de fibronectine et de collagène de type IV dans le compartiment stromal des endomètres issus de femmes souffrant d'une infertilité inexpliquée (Bilalis *et al.*, 1996). Le remodelage des composantes de cette matrice lors de la décidualisation primaire semble donc être primordial au bon déroulement du processus d'implantation embryonnaire et lors de la mise en place des interactions trophoblaste-endomètre (**Figure 16**).

Au cours de la décidualisation, les cellules déciduales acquièrent également des capacités de **contractilité**. En effet, la décidualisation induit une modification du cytosquelette avec l'expression des isoformes d'**actine** *α*, de **desmine** (préférentiellement exprimées dans les cellules musculaires) et de **vimentine**. Ces modifications structurelles induisent une augmentation de la **motilité** des cellules déciduales comparativement aux cellules stromales, suggérant fortement qu'elles jouent un rôle actif au cours de l'**encapsulation du blastocyste** observé lors de la nidation (Benirschke *et al.*, 2012).

#### \* La réaction déciduale secondaire contrôle l'invasion trophoblastique

L'invasion trophoblastique est un processus fréquemment comparé à celui de l'invasion tumorale. En effet, le trophoblaste extravilleux à la base de la villosité crampon se comporte comme un tissu « **pseudo-tumoral** » au cours des phases de migration et de colonisation de l'endomètre. Les mécanismes sont effectivement très similaires (**Figure 15**). A la manière du processus tumoral, l'invasion trophoblastique débute par une phase de **prolifération** importante suivie d'un remaniement du répertoire des intégrines et des cadhérines permettant l'acquisition de propriétés invasives (Canel *et al.*, 2013). Puis, les cellules invasives (trophoblastiques et cancéreuses) progressent au sein du tissu en sécrétant des métalloprotéases qui digèrent la matrice extracellulaire. Elles orientent alors leur **migration** vers les vaisseaux sanguins, les restructurent et produisent des **signaux angiogéniques** (Holtan *et al.*, 2009; Gialeli *et al.*, 2011). Enfín, les cellules tumorales comme les cellules trophoblastiques contrôlent le système immunitaire du tissu hôte et échappent au rejet immunologique en induisant une **réponse tolérogène** (Holtan *et al.*, 2009).

• 46 •



Figure 15. Comparaison de l'invasion trophoblastique et de l'invasion tumorale.

Cependant, la différence fondamentale entre l'invasion tumorale et l'invasion trophoblastique réside dans le fait que cette dernière ne constitue pas un processus anarchique échappant totalement au contrôle de l'organisme. L'invasion trophoblastique est hautement régulée, de manière **spatiale** et **temporelle**. L'endomètre joue alors un rôle essentiel. Au cours de la réaction déciduale secondaire qui concerne uniquement la zone d'implantation, la décidue primaire se transforme en *decidua basalis* (**Figure 16**). Les cellules immunitaires (notamment les cellules uNK et les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>) sont recrutées en masse par chémoattraction. Ces cellules sécrètent des cytokines responsables de l'**apoptose des cellules trophoblastiques** limitant ainsi l'invasion (von Rango *et al.*, 2003; Fritz and Speroff, 2011). Les cellules déciduales réorganisent également la matrice extracellulaire. Toutefois, les mécanismes diffèrent de ceux observés au cours de la décidualisation primaire. Durant cette période, les cellules endométriales sécrètent des enzymes (métalloprotéases, plasminogène) et leurs inhibiteurs, notamment le PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) et les TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases). Ces molécules **contrôlent la progression des trophoblastes extravilleux** dans l'endomètre (Kierszenbaum, 2006). L'ensemble des mécanismes impliqués dans le contrôle de l'invasion trophoblastique sera détaillé dans le **CHAPITRE 2**.

Enfin, il a été démontré que la décidue favorise la **formation des cellules géantes**, stade ultime de la voie de différenciation de la lignée extravilleuse. Ces cellules polynucléées ont perdu leurs propriétés

• 47 •

invasives. En revanche, il a été démontré dans le cas d'implantation ectopique dans les trompes de Fallope, que les cellules géantes sont présentes en faible densité (Loke and King, 1995; Merviel *et al.*, 2001). Ainsi, la décidue semble contrôler l'invasion trophoblastique en modulant la balance entre les cellules géantes non-invasives et les cytotrophoblastes extravilleux invasifs.



#### Figure 16. Mécanismes régulant l'ancrage des cellules trophoblastiques dans l'endomètre.

Sous l'effet de la progestérone, les cellules stromales endométriales se différencient en cellules déciduales produisant les composantes de la matrice extracellulaire et favorisant les interactions trophoblaste-endomètre dans la zone déciduale primaire (A). Les cellules déciduales augmentent également leur motilité et favorisent la nidation. Puis, au cours de la phase invasive, la zone déciduale secondaire appelée *decidua basalis* se forme (B). De nombreuses enzymes déciduales contrôlent alors le potentiel invasif des cellules trophoblastiques extravilleuses.

## 2. L'endomètre : un tissu nourricier

Au cours du premier trimestre de grossesse, l'endomètre assure la fonction nutritive de l'embryon par un processus appelé **nutrition histiotrophe** (Burton *et al.*, 2002; Hempstock *et al.*, 2004).

Certaines espèces présentant une reproduction saisonnière (ours, chevreuil, vison) sont vulnérables aux variations des conditions climatiques et métaboliques. Elles mettent alors en place la **diapause embryonnaire** correspondant à un arrêt complet du développement de l'embryon (Saint-Dizier and Chastant-Maillard, 2014). Chez la souris, une diapause embryonnaire permet d'éviter que la lactation et une nouvelle gestation ne se déroulent pendant la même période (Ptak *et al.*, 2012; Saint-Dizier and Chastant-Maillard, 2014). Au cours de cette phase de diapause qui peut durer plusieurs mois, l'embryon

• 48 •

est libre dans la cavité utérine. Il a épuisé toutes ces réserves nutritives et dépend donc pleinement de l'environnement maternel et des **sécrétions endométriales** riches en glycogène, en protéines et en lipides (Hempstock *et al.*, 2004).

Longtemps, il a été considéré que la nutrition histiotrophe ne concernait que les espèces présentant une phase de diapause embryonnaire. Cependant, une étude récente réalisée chez le vison a démontré que cette nutrition histiotrophe s'observe également au cours de la gestation précoce (Dean *et al.*, 2014). Ces données confirment des résultats antérieurs obtenus chez des espèces ne présentant pas de diapause embryonnaire, comme le chat, le mouton ou encore le furet (Dawson and Kosters, 1944; Buchanan, 1969; O'shea and Murdoch, 1978). Une autre étude réalisée *in vivo* dans un modèle ovin dépourvu de **glandes endométriales** (uterine gland knock-out UGKO model) montre que l'ablation des glandes utérines ne perturbe pas l'implantation embryonnaire. En effet, l'expression des mucines et des intégrines à la surface de l'épithélium utérin est normale. En revanche, la gestation subit un arrêt précoce suite à des défauts de croissance embryonnaire, suggérant que les sécrétions endométriales sont essentielles au cours des premiers stades de la gestation (Gray *et al.*, 2002).

Chez l'**espèce humaine**, les connaissances concernant la nutrition histiotrophe ont progressivement évolué. En particulier, des mesures échographiques ont permis de démontrer l'absence de sang maternel dans la chambre intervilleuse au cours des douze premières semaines de grossesse (Hustin and Schaaps, 1987). Puis, quelques années plus tard, la mise en évidence de l'augmentation de la pression en oxygène dans la chambre intervilleuse a confirmé que le sang maternel se déverse dans la chambre intervilleuse, seulement après dix à douze semaines de grossesse. L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'embryon humain se développe au cours de la gestation précoce, grâce aux sécrétions endométriales (Burton *et al.*, 2002).

Aujourd'hui, il est donc clairement établi que la nutrition histiotrophe se met en place chez l'espèce humaine dès l'entrée du blastocyste dans la cavité utérine et perdure jusqu'à la fin du premier trimestre de grossesse. La nutrition histiotrophe correspond à la **sécrétion de molécules nutritives** (glycogène, protéines et lipides) par les cellules endométriales dans la chambre intervilleuse (Merviel *et al.*, 2001).

Les nutriments sont ensuite réabsorbés par un mécanisme d'endocytose par le syncytiotrophoblaste (Burton *et al.*, 2002, 2011; Hempstock *et al.*, 2004; Burke *et al.*, 2013).

Plus particulièrement, la production de **glycogène** pendant la grossesse semble être cruciale pour assurer une croissance fœtale correcte. Il a ainsi été observé que les taux de glycogène sont diminués dans l'endomètre de femmes souffrant d'une **infertilité** non expliquée (Maeyama *et al.*, 1977). L'accumulation des molécules nutritives dans le cytoplasme des cellules endométriales est totalement dépendante de la **décidualisation** et de l'action de la progestérone (Dockery *et al.*, 1988; Irwin *et al.*, 1989; Hempstock *et al.*, 2004; Krenzer *et al.*, 2006). Ainsi, la production de glycogène, augmente au cours de la décidualisation et atteint un pic lors de la phase mi-sécrétoire correspondant à la « fenêtre d'implantation » (Mimori *et al.*, 1981).

Au cours de la décidualisation, les cellules déciduales acquièrent un phénotype se rapprochant des cellules épithéliales. On parle de **cellules épithélioïdes**. Certaines deviennent alors sécrétoires et forment les **glandes déciduales** qui libèrent les molécules nutritives dans la chambre intervilleuse (Benirschke *et al.*, 2012). La libération du contenu nutritif par les cellules déciduales glandulaires est de type **apocrine**. Au cours de la décidualisation, le noyau glycogénique et les gouttelettes lipidiques se forment au pôle apical de la cellule induisant la fragmentation de la membrane plasmique et l'expulsion du produit de sécrétion (Demir *et al.*, 2002). Les organites situés au pôle basal permettent à la cellule de garder ses capacités sécrétoires même après la perte de son pôle apical (**Figure 17**). La sécrétion apocrine (ou apocytose) est également observée lors de la sécrétion des molécules nutritives constituant le lait maternel par la glande mammaire.



**Figure 17. Sécrétion apocrine du glycogène et des lipides par les cellules déciduales glandulaires.** Les cellules déciduales accumulent les molécules nutritives dans leur pôle apical. Suite au détachement de la membrane plasmique, les nutriments sont sécrétés. Les organites intracellulaires regroupés dans le pôle basal permettent au pôle apical de se renouveler progressivement.

La sécrétion glandulaire endométriale nécessite la **colonisation des glandes utérines** par les cellules trophoblastiques invasives, d'une manière similaire au phénomène observé lors du remodelage des artères (Burton *et al.*, 2001, 2007). Les glandes s'ouvrent sur la chambre intervilleuse et sécrètent le glycogène, les lipides et les protéines qui sont absorbés par le syncytiotrophoblaste (**Figure 18**).





Modifié d'après Burton *et al.* 2007. L'invasion trophoblastique orientée vers les glandes utérines permet aux sécrétions endométriales d'atteindre la chambre intervilleuse. Le syncytiotrophoblaste les transmet ensuite au fœtus par l'intermédiaire des capillaires fœtaux présents au sein de la villosité choriale.

## 3. L'endomètre : un tissu paracrine et endocrine

Les cellules déciduales et notamment celles constituant la *decidua basalis* joue un rôle paracrine important. Ces cellules sécrètent de nombreuses molécules qui modulent des fonctions endométriales diverses, telles que la **décidualisation**, l'**immunomodulation**, la **sécrétion** et le **contrôle de l'invasion** trophoblastique (**Tableau 2**). Une diminution de la synthèse de ces facteurs peut être impliquée dans la survenue de plusieurs complications de la grossesse (Benirschke *et al.*, 2012).

#### ✤ <u>La prolactine</u>

La prolactine est l'hormone la plus abondamment produite par les cellules déciduales. Elle constitue ainsi un excellent **marqueur de décidualisation**. La synthèse de prolactine est induite à chaque cycle menstruel, lors de la phase sécrétoire. Au cours de la grossesse, son expression augmente progressivement durant les premiers mois. Elle s'accumule au sein du **liquide amniotique** et atteint un pic autour de la 24<sup>ème</sup> semaine. Elle pourrait être impliquée dans la régulation de l'homéostasie ionique

et dans le contrôle du volume de liquide amniotique (Jabbour and Critchley, 2001; Benirschke *et al.*, 2012).

La prolactine est une protéine de 23 kDa (199 acides aminés) codée par le gène *PRL* situé sur le chromosome 6. Il existe une forme tronquée de 16 kDa issue du clivage de la forme longue. Ce clivage est réalisé par différentes enzymes dont les MMP (metalloproteinases), la BMP-1 (bone morphogenic protein-1) et la cathépsine D (Lkhider *et al.*, 2010). La structure de la prolactine déciduale ne diffère pas de la prolactine hypophysaire (Tomita *et al.*, 1982). En revanche, l'expression de la prolactine déciduale est insensible aux facteurs régulateurs de la prolactine hypophysaire tels que le facteur de transcription Pit-1 (pituitary-specific positive transcriptor-1), les œstrogènes et la dopamine. L'expression de la prolactine dans l'endomètre est ainsi principalement induite sous l'action de la **progestérone** (Jabbour and Critchley, 2001).

Chez l'Homme, deux isoformes (forme courte et forme longue) de récepteurs de la prolactine (PR-R) ont été mis en évidence (Jabbour and Critchley, 2001; Gorvin, 2015). Ces récepteurs sont notamment présents dans la glande mammaire où la prolactine hypophysaire induit un effet mammotrope (développement des glandes mammaires) et lactotrope (sécrétion du lait maternel) au cours de la grossesse (Gorvin, 2015). La prolactine déciduale semble exercer des effets similaires sur les glandes endométriales. Les deux formes de PR-R ont été détectées dans l'utérus de nombreuses espèces incluant l'espèce humaine (Jabbour and Critchley, 2001; Harris *et al.*, 2004). Elles sont notamment exprimées dans l'**épithélium glandulaire** (Burton *et al.*, 2007). Dans l'endomètre, la liaison prolactine/PR-R induit l'activation de la voie JAK2-STAT (janus kinase 2-signal transducer and activator of transcription). La phosphorylation des protéines JAK2, STAT2 et STAT5 favorise le **développement** et les **capacités sécrétrices** des cellules déciduales constituant l'épithélium glandulaire (Jabbour and Critchley, 2001; Burton *et al.*, 2007). La prolactine possède 67% d'homologie avec l'hormone lactogène placentaire (hPL). Ainsi, l'hPL peut se lier aux récepteurs de la prolactine et induire des effets pro-sécrétoires dans les cellules endométriales (Burton *et al.*, 2007).

La prolactine favorise également l'**implantation embryonnaire** en agissant sur l'épithélium luminal et le trophoblaste (Jabbour and Critchley, 2001). L'importance du signal prolactine/PR-R a été observée

• 52 •

dans un modèle de souris dont les gènes codant ces protéines ont été invalidés. En effet, ces souris sont stériles et leur utérus est totalement réfractaire à l'implantation (Jabbour and Critchley, 2001). Chez la femme, une faible production de prolactine par la décidue est associée à l'infertilité et à la survenue de fausses-couches spontanées à répétition (Garzia *et al.*, 2004; Benirschke *et al.*, 2012).

La prolactine favorise également la migration et l'invasion des cellules trophoblastiques en remaniant le répertoire d'expression des intégrines (Stefanoska *et al.*, 2013). Cette hormone constitue également un **facteur immunomodulateur** majeur. En effet, son récepteur est exprimé dans les cellules immunitaires endométriales (Jabbour and Critchley, 2001). Enfin, la prolactine constitue un signal **angiogénique** impliqué dans la mise en place du réseau sanguin placentaire. Cependant, l'interface fœto-maternelle contrôle ces effets angiogéniques de la prolactine, en synthétisant la cathépsine D qui clive la prolactine. La protéine clivée exerce alors des effets anti-angiogéniques (Jabbour and Critchley, 2001).

### ✤ <u>La relaxine</u>

La relaxine est une hormone peptidique de 6 kDa dont la structure est proche de celle de l'insuline. Chez l'Homme, il existe plusieurs isoformes codées par trois gènes *RLN* situés sur le chromosome 9 (*RLN-1* et *RLN-2*) et le chromosome 19 (*RLN-3*). La relaxine est essentiellement produite par les cellules du corps jaune, le placenta et l'utérus. Elle est décrite pour ses **propriétés myorelaxantes** (Chartrel and Vaudry, 2002). Chez plusieurs espèces animales (porc, rat, cobaye), la relaxine est impliquée dans l'adaptation des voies génitales à l'état de gestation et dans l'inhibition des contractions myométriales. Elle induit également le relâchement du col de l'utérus lors de la parturition (Chartrel and Vaudry, 2002). Chez la femme, ces capacités myorelaxantes permettent le relâchement de la symphyse pubienne et du myomètre adaptant ainsi le corps de la femme à la grossesse (Merviel *et al.*, 2001; Chartrel and Vaudry, 2002). La relaxine est également impliquée dans le phénomène de **décidualisation**. Elle induit notamment l'expression de la prolactine et du VEGF par les cellules déciduales. Elle est ainsi impliquée dans **l'angiogenèse utérine** au cours de la maturation endométriale (Telgmann and Gellersen, 1998). Enfin, elle crée un environnement bénéfique au **recrutement des cellules immunitaires** (cellules NK, macrophages et lymphocytes T CD4<sup>+</sup>) au sein du stroma utérin (Goldsmith and Weiss, 2009).

• 53 •

Plusieurs travaux démontrent que la relaxine contrôle le **remodelage de la matrice extracellulaire** en stimulant l'activité de différentes métalloprotéases (MMP-1, MMP-3 et MMP-7) et en diminuant la teneur en collagène au sein des différentes membranes constituant l'interface fœto-maternelle (Qin *et al.*, 1997; Weiss and Goldsmith, 2005; Goldsmith and Weiss, 2009; Benirschke *et al.*, 2012). La relaxine serait ainsi impliquée lors de la **rupture des membranes** au cours de l'accouchement. Une surproduction de cette hormone chez la femme pourrait donc être à l'origine d'un accouchement prématuré (Benirschke *et al.*, 2012).

### ✤ La glycodéline A

La glycodéline A est une glycoprotéine de 28 kDa, également appelée PP14 (placental protein 14). Le gène PP14 est localisé sur le chromosome 9. La glycodéline A est très impliquée dans la mise en place de la **réponse tolérogène** par l'endomètre. Elle module notamment l'activité des cellules uNK. De plus, elle favorise la différenciation des lymphocytes T selon la voie Th2 et induit la mort des cellules lymphocytaires pro-inflammatoires Th1 par apoptose (Merviel *et al.*, 2001; Benirschke *et al.*, 2012).

### ✤ <u>Le LIF (leukemia inhibitory factor)</u>

Le LIF est une cytokine de 20 kDa dont le gène est situé sur le chromosome 22. Le LIF et son récepteur LIF-R sont produits par les cellules glandulaires, épithéliales et stromales de l'endomètre humain. Ces deux protéines sont également présentes à la surface du blastocyste. Le système LIF/LIF-R constitue ainsi un acteur clé du **dialogue embryo-maternel**.

Le rôle de cette glycoprotéine au cours de la maturation endométriale a été observé chez des souris dont le gène codant ce facteur a été invalidé. Chez ces animaux, la décidualisation est très perturbée. Les cellules stromales peinent à se différencier en cellules déciduales. L'expression des marqueurs de la décidualisation tels que la desmine et le facteur de transcription *HOXA-10* augmente peu au cours du temps. De plus, les pinopodes n'apparaissent pas sur la membrane apicale des cellules épithéliales et le glycocalyx reste très développé, suggérant que les phase d'apposition et d'adhésion de l'embryon sont fortement perturbées dans ce modèle (Fouladi-Nashta *et al.*, 2005).

Le LIF stimule la décidualisation induite par la progestérone *via* l'activation de la protéine STAT3. Il stimule également la synthèse des prostaglandines dans l'endomètre décrites pour induire la **décidualisation**. Au sein des cellules épithéliales, le LIF induit l'expression de différents facteurs favorisant l'**adhésion blastocyste-endomètre** tels que l'EGF et le HB-EGF dont les récepteurs sont exprimés à la surface du blastocyste. Il augmente également la production de cadhérines, d'intégrines et de sélectines et régule l'épaisseur du glycocalyx dans l'épithélium utérin (Guzeloglu-Kayisli *et al.*, 2009; Salleh and Giribabu, 2014).

Le LIF contrôle également l'**invasion** en diminuant l'expression des inhibiteurs d'invasion TIMP-1,-2,-3 et de l'intégrine  $\beta$ 4 pro-invasive. Il favorise également la prolifération des cytotrophoblastes extravilleux et leur différenciation en cellules géantes (Takahashi *et al.*, 2008; Salleh and Giribabu, 2014). Enfin, il s'agit d'un **immunorégulateur** important dans l'endomètre. En effet, il augmente le nombre de macrophages et diminue celui des cellules uNK au sein de la décidue (Salleh and Giribabu, 2014).

## ✤ Les interleukines (IL)

L'endomètre produit de nombreuses interleukines impliquées dans la **réponse immunitaire**. Il sécrète notamment les interleukines IL-6, IL-8, IL-11 et IL-15 qui jouent un rôle majeur dans le recrutement des cellules immunitaires (Vinketova *et al.*, 2016). IL-11 et IL-15 présentent également un rôle antiinflammatoire en inhibant l'activité cytotoxique des cellules uNK. De plus, IL-11 exerce un rôle prodifférenciant au cours de la décidualisation (Guzeloglu-Kayisli *et al.*, 2009). En revanche IL-6 est une cytokine pro-inflammatoire qui favorise la différenciation lymphocytaire Th1, diminuant ainsi l'immunotolérance de l'endomètre vis-à-vis de l'embryon (Hanssens *et al.*, 2012). Tableau 2. Principaux facteurs produits par l'endomètre humain.

HORMONES	
Prolactine	<ul> <li>✓ développement de l'épithélium glandulaire utérin</li> <li>✓ sécrétions glandulaires endométriales</li> <li>✓ implantation embryonnaire</li> <li>✓ invasion trophoblastique</li> <li>✓ immunotolérance</li> <li>✓ angiogenèse placentaire (forme longue)</li> <li>✓ angiogenèse placentaire (forme clivée)</li> </ul>
Relaxine	<ul> <li>relâchement de la symphyse pubienne</li> <li>relâchement du myomètre</li> <li>décidualisation</li> <li>angiogenèse utérine</li> <li>recrutement des cellules immunitaires dans la décidue</li> <li>remodelage des matrices extracellulaires</li> <li>rupture des membranes lors de l'accouchement</li> </ul>
GLYCOPROTEINES	
Glycodéline A	<ul> <li>cytotoxicité des cellules NK déciduales</li> <li>différenciation lymphocytaire immunotolérante Th2</li> <li>apoptose des lymphocytes Th1</li> </ul>
LIF	<ul> <li>A apparition des pinopodes sur les cellules endométriales</li> <li>△ épaisseur du glycocalyx endométrial</li> <li>A expression des cadhérines, séléctines et intégrines</li> <li>A expression des facteurs de croissance EGF et HB-EGF</li> <li>A prolifération des cellules trophoblastiques extravilleuses</li> <li>A différenciation des cellules géantes extravilleuses</li> <li>△ invasion trophoblastique</li> <li>△ nombre de cellules NK déciduales</li> <li>A recrutement des macrophages dans la décidue</li> </ul>
INTERLEUKINES	
IL-6	<ul> <li>↗ recrutement des cellules immunitaires</li> <li>↗ différenciation lymphocytaire pro-inflammatoire Th1</li> </ul>
IL-8	→ recrutement des cellules immunitaires
IL-11	<ul> <li>↗ recrutement des cellules immunitaires</li> <li>↗ décidualisation</li> <li>↘ activité cytotoxiques des cellules NK déciduales</li> </ul>
IL-15	<ul> <li>↗ recrutement des cellules immunitaires</li> <li>↘ activité cytotoxiques des cellules NK déciduales</li> </ul>

# I. Rôles du placenta dans l'unité fœto-maternelle

Le placenta est un organe hautement spécialisé qui exerce de nombreux rôles au cours de la grossesse. La fonction principale de l'organe est d'assurer à l'embryon puis au fœtus, un **apport nutritif** constant tout au long de la période intra-utérine. Le placenta est également un **organe endocrine** synthétisant de nombreuses hormones permettant le maintien de la gestation. Enfin, il agit comme un filtre vis-à-vis de nombreuses substances (pathogènes, xénobiotiques) et constitue ainsi un **organe protecteur** majeur de l'embryon.

### 1. La fonction endocrine

Les hormones placentaires jouent un rôle essentiel dans l'établissement et le maintien de la grossesse. Elles sont produites majoritairement par le **syncytiotrophoblaste**. Cependant, les **cellules géantes** extravilleuses sont également capables de synthétiser certaines hormones (al Lamki *et al.*, 1999). On distingue plusieurs types de facteurs sécrétés par le placenta, en particulier des hormones polypeptidiques et des hormones stéroïdes agissant de manière endocrine, paracrine et autocrine (Gude *et al.*, 2004; Evain-Brion and Malassiné, 2011). Seules les principales hormones placentaires sont décrites dans cette partie (**Tableau 3**).

### L'hormone chorionique gonadotrope (hCG)

L'hCG est une hormone polypeptidique constituée de deux sous-unités La **sous-unité**  $\alpha$  est commune aux hormones hypophysaires telles que la FSH et la LH. La **sous-unité**  $\beta$  est propre à chaque hormone et confère donc à l'hCG sa spécificité biologique. Une fois traduite dans la cellule, chaque sous-unité subit des **réactions de glycosylation** nécessaires à l'assemblage final et à la sécrétion de la protéine. Ces modifications post-traductionnelles stabilisent également la protéine et modulent ses capacités de liaison à son récepteur (Merviel *et al.*, 2001; Evain-Brion and Malassiné, 2011). L'hCG et la LH présentent 96% d'homologie de structure, leur permettant de partager le même récepteur. Cependant l'hCG possède une affinité nettement supérieure à la LH (Tsampalas *et al.*, 2010; Fournier, 2016). Le **récepteur LH/hCG** active l'adénylate cyclase et la production d'AMP cyclique (Casarini *et al.*, 2012). L'hCG est synthétisée dès le 7<sup>ème</sup> jour post-fécondation. Elle constitue donc le premier signal synthétisé par les cellules trophoblastiques au cours de l'implantation embryonnaire. De plus, l'hCG est utilisée comme un **marqueur sérique de la grossesse**. En effet, la production d'hCG augmente progressivement au cours du développement placentaire et atteint un pic aux alentours de la 10<sup>ème</sup> semaine de grossesse. Les taux plasmatiques chutent alors brutalement et restent stationnaires au cours des deuxième et troisième trimestres (Merviel *et al.*, 2001; Evain-Brion and Malassiné, 2011). Son dosage permet de détecter certaines pathologies associées à la grossesse. En effet, sa production est très basse lors de la fausse-couche. A l'inverse, une production d'hCG très importante est l'un des signes de la trisomie 21 et de la pré-éclampsie (Merviel *et al.*, 2001; Basirat *et al.*, 2006).

L'hCG est principalement produite par le syncytiotrophoblaste. Elle exerce un rôle endocrine sur l'ovaire qui permet la transformation et le **maintien du corps jaune**. Elle assure ainsi la synthèse d'hormones stéroïdes avant que l'unité fœto-maternelle ne prenne le relais (Merviel *et al.*, 2001; Evain-Brion and Malassiné, 2011). Elle exerce également un effet autocrine sur le syncytiotrophoblaste, en favorisant la **différenciation des cytotrophoblastes villeux** sous-jacents (Yang *et al.*, 2003).

L'hCG agit également de manière paracrine dans l'utérus. Elle favorise l'**implantation embryonnaire** en agissant sur les cellules épithéliales et stromales de l'endomètre et sur les cellules myométriales (Cole, 2010). Plus précisément, l'hCG augmente l'expression de la trophinine dans le pole apical de l'épithélium utérin, favorisant ainsi les interactions trophoblaste-endomètre. Dans les cellules déciduales, l'hCG inhibe l'expression de TIMP-1 et stimule l'activité de MMP-2, contribuant à la réorganisation de la matrice extracellulaire. Elle favorise donc la mise en place d'un environnement endométrial pro-invasif (Tapia-Pizarro *et al.*, 2013). L'hCG participe également au **relâchement du myomètre** en contrôlant les taux de calcium intracellulaires et limite ainsi la contractilité cellulaire au cours de la grossesse (Tsampalas *et al.*, 2010).

De plus, l'hCG agit sur l'**immunotolérance endométriale**. Elle induit notamment le recrutement des cellules NK au sein de la décidue et la différenciation des lymphocytes T régulateurs (Treg). L'hCG stimule l'activité phagocytaire des macrophages. Enfin, elle favorise le production de l'IL-8, une cytokine impliquée dans le recrutement des cellules immunitaires (Tsampalas *et al.*, 2010).

• 58 •

L'hCG stimule l'**angiogenèse endométriale** en augmentant la production du VEGF, du PIGF et de l'angiopoïétine par les cellules endothéliales. Elle diminue également la résistance des vaisseaux sanguins maternels en inhibant la production d'agents vasoconstricteurs tels que les eicosanoïdes. L'hCG participe donc à la réorganisation du système vasculaire utérin indispensable à une placentation correcte (Cole, 2010; Tsampalas *et al.*, 2010).

L'hCG est majoritairement produite par le syncytiotrophoblaste. Cependant, des travaux révèlent que cette hormone est également synthétisée par les cytotrophoblastes extravilleux invasifs et les cellules géantes (al Lamki *et al.*, 1999; Handschuh *et al.*, 2007; Fournier, 2016). Dans ces cellules, l'hCG est présente sous une forme hyperglycosylée appelée h-hCG qui représente 87% de la protéine totale au cours de la troisième semaine de grossesse (Evans, 2016). Ce ratio chute à 43% la cinquième semaine et il est inférieur à 1% à partir du deuxième trimestre (Cole, 2010). Ces données suggèrent fortement que la principale fonction de l'h-hCG est le contrôle de l'implantation embryonnaire et notamment de la phase invasive. En effet, une étude a montré que l'h-hCG stimule l'**invasion trophoblastique** en augmentant l'activité des enzymes MMP-2 et MMP-9 et de l'activateur du plasminogène (uPA) dans les cytotrophoblastes extravilleux (Lee *et al.*, 2013).

### L'hormone lactogène placentaire (hPL)

L'hPL est produite par le tissu placentaire et notamment par le syncytiotrophoblaste (Merviel *et al.*, 2001; Evain-Brion and Malassiné, 2011). Cependant, les cellules géantes de la lignée extravilleuse sont également capables de la synthétiser (al Lamki *et al.*, 1999). Sa production débute à la sixième semaine et augmente tout au long de la grossesse proportionnellement à la masse placentaire. Il s'agit de l'**hormone la plus abondamment produite** par le placenta (10% de la production protéique soit une concentration maternelle située entre 5 et 15  $\mu$ g/ml au cours du troisième trimestre). Sa structure protéique est très similaire à l'hormone de croissance et à la prolactine. Ainsi, une mutation partielle ou totale des gènes codant l'hPL n'entraîne aucune complication au cours de la grossesse, l'une de ses deux protéines compensant vraisemblablement l'action de l'hPL délétée (Merviel *et al.*, 2001).

Au cours de la grossesse, l'hPL exerce un effet prolifératif et pro-sécrétoire dans les cellules mammaires et dans les cellules endométriales (Burton *et al.*, 2007; Evain-Brion and Malassiné, 2011). L'hPL semble

• 59 •

être impliquée dans la régulation de la **croissance fœtale**. En effet, il a été observé une corrélation positive entre les taux sériques maternels d'hPL et le poids du nourrisson. En particulier, de faibles concentrations de cette hormone sont associées à la survenue du retard de croissance *in utero* (Bagga *et al.*, 1990). L'injection chronique d'hPL chez la ratte gestante est responsable d'une élévation du poids des ratons à la naissance (Collins *et al.*, 1988). Ces effets sont associés à une augmentation de la synthèse des facteurs de croissance IGF-1 et IGF-2 (insulin-like growth factor) chez le fœtus humain (Kagan Karabulut *et al.*, 2001). De plus, l'hPL augmente la quantité de nutriments disponibles pour le fœtus. En effet, l'hPL exerce une action leptino-résistante, qui induit une augmentation de la prise alimentaire chez la mère. L'hPL réduit également la consommation de glucose par les cellules musculaires maternelles et induit une hausse des taux d'acides gras libres dans le sang, en stimulant la lipolyse adipocytaire (Blackburn, 2007; Oratz, 2014; Tan and Brosens, 2015). Ainsi, l'hPL augmente indirectement la croissance fœtale.

### ✤ L'hormone de croissance placentaire (hPGH)

Au cours du premier trimestre, le cytotrophoblaste extravilleux sécrète l'hPGH qui exerce alors un **effet pro-invasif** autocrine (Evain-Brion and Malassiné, 2011). A partir du deuxième trimestre et jusqu'au terme de la grossesse, l'hormone de croissance est sécrétée par le syncytiotrophoblaste. Sa synthèse augmente progressivement tout au long de la gestation, remplaçant peu à peu l'hormone de croissance hypophysaire, qui devient quasiment indétectable dans la circulation sanguine (Evain-Brion and Malassiné, 2011; Oratz, 2014). Bien qu'elle ne soit pas détectée dans la circulation fœtale, elle participe au **contrôle de la croissance du fœtus** en modulant la disponibilité des nutriments dans le compartiment maternel. Plus précisément, elle active les voies anaboliques hépatiques (lipogenèse et néoglucogenèse) et induit la lipolyse dans le tissu adipeux, augmentant ainsi les taux de lipides et glucides dans le sang maternel (Oratz, 2014). En parallèle, elle réduit la consommation de glucose par les cellules musculaires maternelles (Evain-Brion and Malassiné, 2011). Avec l'hPL, l'hPGH participe donc activement à l'établissement de l'**insulino-résistance** spécifique de la grossesse.

## Les œstrogènes

Le placenta ne possède pas l'équipement enzymatique nécessaire à la conversion de la prégnénolone en androgènes. Hors, les œstrogènes dérivent des androgènes par aromatisation. La synthèse placentaire d'œstrogènes dépend donc d'un apport externe en androgènes. La DHEAS (sulfate de déhydroépiandrosterone) fournie par les glandes surrénales maternelles et fœtales est à l'origine de la formation d'œstrone d'œstradiol (E2). La 16α-DHEAS (E1) et (sulfate de  $16\alpha$ déhydroépiandrosterone) est synthétisé par le foie fœtal et constitue le précurseur de l'œstriol (E3). (Evain-Brion and Malassiné, 2011) (Figure 20).

Comme pour la progestérone, le placenta prend le relais du corps jaune à partir de la fin du premier trimestre et synthétise des doses croissantes d'œstrogènes jusqu'à l'accouchement (Evain-Brion and Malassiné, 2011). La production d'E1 et d'E2 augmente d'un facteur 100 et celle de l'E3 d'un facteur 1000 (Blackburn, 2007). La connaissance du rôle des œstrogènes placentaires reste parcellaire. Ils participent au développement placentaire en stimulant la **différenciation trophoblastique**. Les œstrogènes jouent également un rôle positif sur le **développement de la glande mammaire** Enfin, les œstrogènes participent au **déclenchement du travail** en augmentant l'expression des protéines impliquées dans la contraction myométriale (prostaglandines, connexin-43, ocytocine) (Griffiths and Campbell; Oratz, 2014).



Figure 19. Synthèse des œstrogènes par le syncytiotrophoblaste.

### La progestérone

La progestérone sécrétée initialement par le corps jaune, induit la maturation endométriale indispensable à l'implantation embryonnaire. Le blastocyste niché dans l'utérus sécrète ensuite de l'hCG qui stimule la production de progestérone par les cellules lutéales du corps jaune au cours des dix premières semaines de grossesse. A partir de ce stade, le syncytiotrophoblaste a acquis le système enzymatique lui permettant de convertir le cholestérol maternel associé aux lipoprotéines de faible densité (LDL) en hormones stéroïdes (Evain-Brion and Malassiné, 2011).

Les LDL se fixent à leurs récepteurs spécifiques exprimés dans la membrane microvillositaire du syncytiotrophoblaste. Le complexe LDL-récepteur est endocyté et guidé vers les lysosomes, où le **cholestérol** est libéré. Le cholestérol libre subit alors une translocation mitochondriale *via* les transporteurs SCP-2 (sterol carrier protein-2) situé dans la membrane externe et MLN64 (metastatic lymph node 64) localisé dans la membrane interne. Il y est converti en **prégnénolone** par le cytochrome P450 scc (cholestrol side schain cleavage) exprimé dans le placenta à partir de la 10<sup>ème</sup> semaine de grossesse. La prégnénolone est ensuite converti en **progestérone** par la 3β-HSD (3β-hydroxystéroïde deshydrogenase/isomerase) (Tuckey, 2005) (**Figure 19**).



Figure 20. Synthèse de la progestérone par le syncytiotrophoblaste.

Au cours de la grossesse, la progestérone permet le **maintien de la gestation** en assurant l'intégrité de l'endomètre et la croissance de l'utérus. Ces effets de la progestérone seront développés dans le

# CHAPITRE 2

La progestérone exerce un rôle important au cours de l'**immunotolérance maternelle** en augmentant la synthèse de la cytokine tolérogène IL-4 et en réduisant celles des cytokines inflammatoires (TNF $\alpha$ , interferon  $\gamma$ , IL-10) (Lissauer *et al.*, 2015). Elle oriente ainsi les lymphocytes T auxiliaires vers la voie de différenciation tolérante Th2. La progestérone stimule également la synthèse de la protéine HLA-G dans le placenta, indispensable à la mise en place de la réponse tolérogène maternelle (Szekeres-Bartho *et al.*, 2009). Elle contrôle la **contractilité du myomètre**, en régulant l'expression des gènes codant pour les canaux ioniques impliqués dans l'entrée du calcium dans la cellule et en diminuant le nombre de récepteurs à l'ocytocine. Elle induit également l'expression des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques augmentant la quiescence myométriale (Al-Asmakh, 2007).

Une faible partie de la progestérone synthétisée par le placenta atteint le compartiment fœtal. Chez le fœtus, la progestérone sert ainsi de précurseur à la synthèse des glucocorticoïdes qui sont nécessaires à la **maturation des glandes surrénales** (Merviel *et al.*, 2001).

Le placenta humain sécrète de nombreux autres facteurs et hormones, en particulier des adipokines (la leptine et la résistine qui sont présentées dans le **CHAPITRE 3**). Enfin, il produit comme l'endomètre, des interleukines et la relaxine (partie H de ce chapitre).

# Tableau 3. Principaux facteurs produits par le placenta humain.

HORMONES POLYPEPTIDIQUES				
hCG	<ul> <li>↗ maintien du corps jaune (sécrétion de progestérone)</li> <li>↗ interactions trophoblaste-endomètre</li> <li>↗ différenciation des cellules trophoblastiques villeuses</li> <li>↗ réorganisation de la matrice extracellulaire endométriale</li> <li>↗ invasion trophoblastique</li> <li>↗ relâchement et quiescence du myomètre</li> <li>↗ angiogenèse utérine</li> </ul>			
hPL	<ul> <li>↗ développement de la glande mammaire</li> <li>↗ développement des glandes endométriales</li> <li>↗ croissance fœtale</li> <li>↗ expression des facteurs de croissance IGF-1 et IGF-2</li> <li>↗ disponibilité des nutriments pour le fœtus</li> <li>↗ insulino-résistance maternelle</li> </ul>			
hPGH	<ul> <li>↗ invasion trophoblastique</li> <li>↗ croissance fœtale</li> <li>↗ disponibilité des nutriments pour le fœtus</li> <li>↗ insulino-résistance maternelle</li> </ul>			
HORMONES STEROÏ	DES			
Progestérone	<ul> <li>↗ immunotolérance maternelle</li> <li>↗ maintien de la gestation</li> <li>↗ relâchement et quiescence du myomètre</li> <li>↗ maturation des glandes surrénales fœtales</li> </ul>			
Œstrogènes	<ul> <li></li></ul>			

# 2. La fonction d'échanges

Une grossesse saine se caractérise par une croissance « normale » du fœtus qui doit **assimiler les nutriments** en provenance du compartiment maternel en quantités suffisantes tout au long de la période intra-utérine. Cependant, comme décrit précédemment les mécanismes de transport de nutriments de la mère au fœtus sont totalement différents lors de la **nutrition histiotrophe** du premier trimestre et de la **nutrition hémotrophe** à partir du deuxième trimestre de grossesse.

Au cours du premier trimestre, les cellules extravilleuses érodent les glandes utérines qui déversent leur contenu nutritif dans la chambre intervilleuse. Les glandes sécrètent le glycogène, les lipides et les

• 64 •

protéines par un mécanisme d'**apocytose**. Les nutriments sont ainsi présents dans la chambre intervilleuse sous une **forme vésiculaire** (Demir *et al.*, 2002; Burton *et al.*, 2007; Benirschke *et al.*, 2012). Ces sécrétions glandulaires sont ensuite réabsorbées par le syncytiotrophoblaste par un mécanisme d'**endocytose** (Burton *et al.*, 2002, 2007; Evain-Brion and Malassiné, 2011; Filant and Spencer, 2014). Plusieurs études suggèrent que ces molécules complexes sont guidées vers les lysosomes placentaires où elles sont dégradées en molécules simples, assimilables par le fœtus (glucose et acides aminés notamment) (Burton *et al.*, 2002; Hempstock *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2015).

Au deuxième trimestre de grossesse, la circulation utéro-placentaire est en place. La barrière placentaire est alors assez épaisse (25 à 50 µm selon les études). Le sang maternel est séparé du sang fœtal par le syncytiotrophoblaste, le cytotrophoblaste villeux, le mésenchyme, l'endothélium et la lame basale des capillaires fœtaux (Jacqz-Aigrain, 1998; Mori *et al.*, 2007; Lüllmann-Rauch, 2008). L'épaisseur de cette barrière se réduit progressivement au cours de la grossesse. A partir du quatrième mois, elle ne mesure plus que 3 µm. Les vaisseaux sanguins se sont multipliés au sein de la villosité choriale et se sont rapprochés de la couche syncytiale. Dans certaines zones de la villosité, le cytotrophoblaste villeux devient discontinu. Les noyaux du syncytium se regroupent au sein de zones de synthèse nucléées où sont assurées les fonctions endocrines. Le syncytiotrophoblaste entre en contact avec les vaisseaux sanguins fœtaux, créant une **zone d'échanges nutritifs privilégiée** (zones anucléées). (Mori *et al.*, 2007; Lüllmann-Rauch, 2008; Le Moigne and Foucrier, 2009) (**Figure 21**). Le syncytiotrophoblaste exprime l'ensemble des systèmes de transport cellulaire dans la membrane microvillositaire et dans la membrane basale.



#### Figure 21. Coupe transversale des villosités choriales.

Modifié d'après Evain-Brion *et al.* 2011. Structure schématique de la villosité choriale du placenta de premier trimestre (A) et à terme (B). L'épaisseur de la « barrière placentaire » diminue au cours de la grossesse. Au troisième trimestre le cytotrophoblaste devient discontinu, permettant au syncytiotrophoblaste de créer des zones d'échange à proximité des vaisseaux sanguins. La fonction endocrine du syncytium est assurée par les zones de synthèse nucléées.

#### ✤ <u>La diffusion passive</u>

La diffusion passive également appelée simple diffusion correspond au mouvement de molécules hydrophobes ou de faible poids moléculaire, selon un **gradient électrochimique**. Une voie « paracellulaire » a également été décrite et correspond au passage de molécules hydrophiles entre deux syncytiums différents qui forment un « pore aqueux ». La diffusion passive concerne essentiellement l'**oxygène**, le **dioxyde de carbone** et l'**urée**. Une partie des **acides gras**, de l'**eau** et des **électrolytes** sont également absorbés par le syncytiotrophoblaste par cette voie (Tucker Blackburn, 2003; Evain-Brion and Malassiné, 2011).

## \* La diffusion facilitée

La diffusion facilitée nécessite la présence de différents systèmes de transport saturables présents dans la membrane microvillositaire du syncytiotrophoblaste. Ce système ne nécessite aucun apport en énergie et s'effectue selon le **gradient électrochimique**. Le transport de l'**eau** est réalisé par les aquaporines et celui des **électrolytes** (K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>) a lieu *via* des canaux ioniques. Le transport du **glucose** et des **lipides** fait lui aussi intervenir ce mécanisme de transport placentaire (Tucker Blackburn, 2003; Evain-Brion and Malassiné, 2011; Lager and Powell, 2012).

• 66 •

Le **glucose** est transporté par les transporteurs GLUT (glucose transporter). GLUT1 correspond à l'isoforme placentaire principale et son expression augmente tout au long de la gestation. GLUT3 est préférentiellement exprimé dans l'endothélium fœtal et dans la membrane microvillositaire syncytiale du placenta de premier trimestre. D'autres isoformes telles que GLUT4 et GLUT12 sont également spécifiques du placenta précoce. Enfin, GLUT8, GLUT9 et GLUT10 sont exprimés dans le placenta humain tout au long de la grossesse (Lager and Powell, 2012).

Le transport des **lipides** dans le placenta est plus complexe. Certains acides gras (notamment les **acides gras à longue chaîne**) et le **cholestérol** se lient à des transporteurs présents dans la membrane microvillositaire tels que FABPpm (fatty acid binding protein plasma membrane), FAT (fatty acid translocase) et FATP (fatty acid transporter protein). Ces deux derniers sont également exprimés dans la membrane basale. Les **acides gras non-estérifiés** traversent également la membrane basale par diffusion simple (Evain-Brion and Malassiné, 2011). Les **lipoprotéines** liées aux récepteurs des VLDL (very low density lipoprotein) situées sur la membrane microvillositaire sont internalisées par endocytose et dégradées par la voie lysosomale. Les triglycérides sont ensuite hydrolysés en acides gras et cholestérol par les lipases du syncytiotrophoblaste et dirigés vers la membrane basale. Une lipoprotéine lipase présente sur la membrane apicale permet également l'hydrolyse des triglycérides liés aux lipoprotéines (Evain-Brion and Malassiné, 2011; Lager and Powell, 2012).

## \* Le transport actif

Le transport actif nécessite des protéines de transport pour le passage de diverses molécules contre le gradient électrochimique. Il est donc dépendant de l'hydrolyse d'ATP. Le **transport actif primaire** concerne les espèces ioniques utilisant des pompes telles que la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase et la Ca<sup>2+</sup> ATPase. Cette pompe est présente uniquement dans la membrane basale. On parle de **transport actif secondaire** ou couplé, lorsqu'une molécule utilise le gradient électrochimique fourni par les pompes ioniques pour son propre passage. C'est le cas notamment des acides aminés (Evain-Brion and Malassiné, 2011).

Les **acides aminés** traversent la barrière placentaire contre le gradient de concentration et sont donc dépendant de ce transport actif. On distingue plus de 20 transporteurs exprimés dans le placenta humain.

Ils sont classés en deux groupes, les **transporteurs sodium-dépendants** et les **transporteurs sodium-indépendants** (Evain-Brion and Malassiné, 2011; Lager and Powell, 2012).

Les transporteurs sodium-dépendants sont appelés SNAT (sodium-coupled neutral amino acid transporter). Ils permettent l'entrée d'**acides aminés neutres**, non-cationiques et non-essentiels, en particulier l'alanine, la sérine et la glycine. Les isoformes SNAT1, SNAT2 et SNAT4 sont exprimées dans le placenta humain de premier trimestre et de troisième trimestre (Evain-Brion and Malassiné, 2011; Lager and Powell, 2012).

Les transporteurs sodium-indépendants fonctionnent comme des échangeurs qui permettent l'entrée d'**acides aminés essentiels** contre la sortie d'un acide aminé neutre. Ils fonctionnent essentiellement en hétérodimère formé des protéines LAT1 et LAT2 (L-type amino acid transporter). LAT1 est exprimé dans la membrane apicale et LAT2 est présent dans la membrane basale (Lager and Powell, 2012).

### \* L'endocytose

Cette voie est essentiellement empruntée au cours de la **nutrition histiotrophe**. Cependant, elle est présente tout au long de la gestation. L'endocytose placentaire assure l'entrée des **immunoglobulines maternelles** et leur transport jusqu'à la membrane basale où elles sont libérées dans le compartiment fœtal. Le **fer** est lui aussi transporté par cette voie, suite à sa liaison à la transferrine qui se lie au récepteur TfnR (transferrin receptor) situé sur la membrane microvillositaire. Ce complexe est ensuite internalisé par les vésicules de clathrines (Evain-Brion and Malassiné, 2011; Lager and Powell, 2012). Outre les clathrines, le système d'endocytose fait également intervenir le complexe mégaline/cubiline exprimé dans le placenta humain (Lambot *et al.*, 2006; Burke *et al.*, 2013). En revanche, la cavéoline constituant l'une des voies endocytiques majeures dans de nombreux organes n'est pas exprimée dans le syncytiotrophoblaste humain (Lyden *et al.*, 2002).

## 3. La fonction de protection

Le placenta constitue un organe de protection pour le fœtus lors d'infections maternelles. En effet, il forme une barrière totalement infranchissable pour la plupart des pathogènes. En revanche, concernant

• 68 •

d'autres agents pathogènes ou infectieux, le placenta n'est pas totalement imperméable. Il va donc retarder l'infection sans la bloquer. Cependant, le nombre de virus, bactéries ou parasites pouvant franchir la barrière hémato-placentaire est très faible (**Tableau 4**). Ils possèdent tous deux caractéristiques communes : 1) une partie du **cycle de vie intracellulaire** et 2) un mode de **dissémination hématogène** (Evain-Brion and Malassiné, 2011; Robbins and Bakardjiev, 2012; Adams Waldorf and McAdams, 2013; Silasi *et al.*, 2015).

Tableau 4.	<b>Principaux</b>	agents	pathogènes	traversant le	e placenta et	complications	associées.

VIRUS	BACTERIES	COMPLICATIONS
HSV (Herpès génital) VZV (Varicelle) CMV (Mononucléose) Rubella (Rubéole) VIH (SIDA) HAV (Hépatite A) HBV (Hépatite B) HEV (Hépatite E) Influenza (Grippe) Ebola (Fièvre hémorragique) Lassa (Fièvre hémorragique) ZIKV (Fièvre Zika) CHIKV (Chikungunya) DENV (Dengue)	L. monocytogenes (Listeriose) M. tuberculosis (Tuberculose) T. pallidum (Syphilis) Brucella (Brucellose) C. burnetti (Fièvre Q)	Fausse-couche Retard de croissance Accouchement prématuré Mort <i>in utero</i> Contamination néonatale Atteintes neurologiques
	PARASITES	Cécité
	T. gondii (Toxoplasmose) T. cruzy (Maladie de Chargas) P. falciparum (Paludisme) Leishmania (Leishmaniose)	Surdité Microcéphalie Hydrocéphalie Malformation congénitale Fœtopathies diverses

Dans la majorité des pays de l'hémisphère Nord, l'infection par certains de ces agents pathogènes est extrêmement rare. La rubéole, la syphilis ou la tuberculose ont une prévalence très faible dans ces pays développés. Ainsi, un grand nombre de pathogènes se limitent à des zones géographiques précises qui dépendent de l'aire de répartition de l'organisme hôte qui les héberge. Par exemple, le virus Ebola transmis par l'intermédiaire de la chauve-souris, présente son foyer d'infection en Afrique Occidentale. Le virus de la dengue (DENV), le virus Chikungunya (CHIKV), le virus Zika (ZIKV) ou encore le parasite responsable du paludisme sont transmis à l'Homme par des moustiques vivant dans les zones tropicales (Amérique du Sud, Afrique Equatoriale, Asie Pacifique).

En France, l'une des infections les plus fréquentes au cours de la grossesse est la **toxoplasmose**. On estime que plus de 6000 françaises sont infectées par ce parasite chaque année au cours de leur grossesse

(Evain-Brion and Malassiné, 2011). La toxoplasmose est généralement bénigne, asymptomatique et non-contagieuse chez les sujets immunocompétents. Cependant, les femmes enceintes non-immunisées reçoivent des conseils hygiéno-diététiques dès le début de la grossesse, l'infection étant dangereuse pour le fœtus. Ainsi, la toxoplasmose congénitale représente la **première fœtopathie infectieuse** recensée en France (Dimier-Poisson and Poutier, 2010).

La toxoplasmose est inoculée par le protozoaire intracellulaire *Toxoplasma gondii*. Il s'agit d'une parasitose transmise essentiellement par le **chat**, l'**hôte primaire** de ce parasite. L'alimentation et notamment la consommation de viande est également une source de contamination non-négligeable. En effet, l'ensemble des **mammifères** et des **oiseaux** constituent des **hôtes secondaires**. Il est estimé que 72% des ovins, 28% des porcins et 2% des bovins sont porteurs du parasite en France (Dimier-Poisson and Poutier, 2010).

Chez la femme enceinte, l'infection du placenta par *Toxoplasma gondii* se réalise préférentiellement à l'interface **trophoblaste extravilleux-décidue** plutôt qu'à l'interface **syncytiotrophoblaste-sang maternel**. Cependant, les deux voies d'infection sont possibles (Robbins *et al.*, 2012). Ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait que la forme végétative du parasite est localisée dans les macrophages. Un nombre conséquent de macrophages infectés atteint donc la décidue au cours du recrutement immunitaire au début de la grossesse (Robert-Gangneux *et al.*, 2011). Le risque de passage de la barrière placentaire par le parasite augmente au cours du temps. Il passe de 6% au premier trimestre à 72% à l'approche du terme (Dimier-Poisson and Poutier, 2010).

Lorsque l'infection a lieu au cours du premier trimestre de grossesse, les conséquences sont particulièrement graves et peuvent aller jusqu'à l'**avortement spontané** et la **mort** *in utero*. La toxoplasmose peut également provoquer de lourds retards psychomoteurs. En effet, le parasite forme des kystes dans le système nerveux. La présence de **calcifications intracrâniennes**, l'**hydrocéphalie** et la **microcéphalie** sont ainsi caractéristiques de la toxoplasmose congénitale. Une hypotonie, des convulsions, des troubles des réflexes associés à des atteintes oculaires et cardiaques sont également très fréquents (Leroy, 2016).
Au cours du second trimestre, les atteintes cérébrales sont plus rares. L'infection se caractérise principalement par les calcifications intracrâniennes et les atteintes oculaires (choriorétinite pigmentaire). Après 24 semaines de grossesse, les atteintes cardiaques (dilatation ventriculaire) ne sont plus observées (Leroy, 2016).

A partir du troisième trimestre, les lésions touchent uniquement les yeux (développement d'une choriorétinite pigmentaire). Le risque de développer cette pathologie se prolonge plusieurs années après la naissance et nécessite donc une surveillance de l'enfant (Leroy, 2016).

# A. La grossesse saine

Chez l'espèce humaine, la durée optimale de la gestation est de neuf mois. Le terme de la grossesse est ainsi estimé entre 37 et 41 semaines d'aménorrhée (S.A) par le corps médical. Si la naissance a lieu en deçà de cette période, on parle de **prématurité**. Elle peut être sévère (avant 28 S.A), grande (avant 32 S.A) ou moyenne (avant 37 S.A). Plus la prématurité est sévère, plus les risques de décès du nourrisson sont importants. L'immaturité du système cardio-respiratoire entraîne des malformations pulmonaires et cardiaques fréquentes. Des troubles de l'audition et de la vue sont également observés. Les grands prématurés sont également plus sujets aux infections. En effet, leur peau est très perméable et fragile. A l'inverse, au-delà de 41 semaines d'aménorrhée, le terme est dépassé et la grossesse est qualifiée de **prolongée**. Ce dépassement de terme est très rare. Il se caractérise par des défauts de la fonction d'échange placentaire qui peuvent entraîner la mort du nourrisson par asphyxie brutale (**Figure 22**).



Figure 22. Durée en S.A de la grossesse prématurée, à terme et prolongée.

Une grossesse saine se caractérise donc par une gestation menée à son terme, sans complications majeures pour le fœtus et pour la mère. L'organisme maternel s'adapte convenablement à la gestation et permet au fœtus de se développer et de grandir dans l'utérus pendant neuf mois. A la naissance, le nourrisson est en bonne santé. L'unité fœto-maternelle doit surmonter plusieurs étapes considérées comme critiques pour assurer cette grossesse physiologique. Elles correspondent à 1) la maturation endométriale, 2) la réceptivité utérine, 3) l'invasion trophoblastique et 4) la croissance fœtale. Elles sont régulées par de nombreux facteurs d'origine maternelle et embryonnaire. Ainsi, la régulation du dialogue au sein de l'unité fœto-maternelle est essentielle lors de la grossesse.

## B. La maturation endométriale

Au cours de chaque cycle menstruel, l'endomètre de la femme subit une phase de maturation appelée **décidualisation**, dans l'éventualité d'accueillir un potentiel embryon. La décidualisation comprend des modifications structurales et biochimiques affectant le compartiment stromal de l'endomètre qui évolue en un tissu hautement spécialisé : la **décidue**. Cette différenciation endométriale est initiée par les hormones ovariennes (œstrogènes et progestérone). Elle se poursuit tout au long de la grossesse sous l'effet de facteurs trophoblastiques et déciduaux (Merviel *et al.*, 2001; Gellersen *et al.*, 2007; Sharma and Kumar, 2012; Wetendorf and DeMayo, 2012; Gellersen and Brosens, 2014; Vinketova *et al.*, 2016).

Plus précisément, les œstrogènes stimulent la prolifération des cellules stromales, induisant un épaississement de la muqueuse utérine. Après l'ovulation, la sécrétion de progestérone par le corps jaune initie la différenciation de ces cellules stromales en **cellules déciduales**. Le stroma utérin prend alors un **aspect œdémateux** très marqué lors la phase mi-sécrétoire du cycle menstruel, correspondant à la période de réceptivité utérine. Parallèlement, les vaisseaux sanguins et les glandes utérines subissent un important développement, indispensable au maintien et à la survie du futur embryon (Gellersen and Brosens, 2014).

La différenciation des cellules endométriales nécessite un **arrêt du cycle cellulaire**. Ainsi, sous l'effet de la progestérone, la transition entre les phases G1/S et G2/M du cycle est bloquée. Ce mécanisme semble être dépendant de l'activation de la protéine p21, une protéine inhibitrice de la formation des complexes cyclines-CDK (cyclin dependant kinase) (Logan *et al.*, 2012). Les cellules endométriales stromales peuvent alors s'engager dans le programme de différenciation, correspondant à une **transition mésenchymato-épithéliale**. Ainsi, l'expression de la cytokératine et de la E-cadhérine est induite dans les cellules déciduales (Zhang *et al.*, 2013b). L'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique, nécessaires à la sécrétion de différents constituants de la **matrice extracellulaire** se développent intensément dans ces cellules. De plus, de nombreuses **jonctions cellulaires** se mettent en place entre les cellules déciduales, en particulier suite à l'augmentation de l'expression de la connexine-43 (Jahn *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 2011). L'apparition de ces protéines intercellulaires pourrait permettre de synchroniser le phénomène de décidualisation à l'ensemble de l'endomètre. Enfin, la décidualisation

s'accompagne de l'accumulation de molécules nutritives, notamment de lipides et de glycogène. Ainsi, une augmentation de l'expression du transporteur de glucose GLUT1 est observée au cours de la décidualisation (Strowitzki *et al.*, 2001). L'accumulation et la sécrétion de **glycogène endométrial** dans l'espace extracellulaire est vraisemblablement responsable de l'aspect œdémateux de la décidue observé lors de la phase sécrétoire (Gellersen and Brosens, 2014).

### 1. La progestérone

La progestérone exerce ses effets en se liant aux récepteurs PR (progesterone receptor) dont il existe deux isoformes, **PRA** et **PRB**. Une équipe a récemment développé une lignée de souris qui n'exprime pas le gène codant l'isoforme PRA. Les femelles sont alors totalement infertiles et présentent des anomalies de la décidualisation et de l'implantation embryonnaire. Les souris invalidées pour le récepteur PRB sont quant à elles fertiles. Cependant, le développement de la glande mammaire est anormal. (Wetendorf and DeMayo, 2012). Chez l'espèce humaine, l'isoforme PRA est l'isoforme dominante au cours de la décidualisation (Maruyama and Yoshimura, 2008). En l'absence de leur ligand, les récepteurs PR sont maintenus dans le cytoplasme des cellules endométriales. Suite à la liaison de la progestérone, ils se dimérisent et induisent des **effets génomiques** et des **effets non-génomiques** impliqués dans la réaction de décidualisation (Maruyama and Yoshimura, 2008; Wetendorf and DeMayo, 2012) (**Figure 23**).

Les effets génomiques sont observés suite à la **translocation nucléaire** des récepteurs PR. Ils possèdent un domaine de liaison à l'ADN leur permettant de réguler directement l'expression de gènes possédant une **séquence PRE** (progesterone response element) dans leur région promotrice. C'est notamment le cas des gènes codant le facteur IGFBP-1 (insulin-like growth factor-binding protein-1) et la prolactine (Maruyama and Yoshimura, 2008). D'autre part, le dimère PR/PR joue un rôle de protéine d'échafaudage pour former un complexe protéique transcriptionnel impliquant les facteurs **FoxO1** (forkhead box O1), **C/EBPβ** (CCAAT/enhancer binding protein beta), **STAT3** et **STAT5** (signal transducer and activator of transcription) (Maruyama and Yoshimura, 2008; Vinketova *et al.*, 2016). Ainsi, la progestérone induit la synthèse de nombreux facteurs endométriaux tels que la prolactine, l'IGFBP-1, la relaxine, l'activine A, la prostaglandine E2, le LIF, les interleukines IL-6 et IL-11 ou le CRF (corticotropin-releasing factor) (Yki-Järvinen *et al.*, 1985; Jensen *et al.*, 1987; Petraglia *et al.*, 1992; Macdonald *et al.*, 2011; Vinketova *et al.*, 2016). Comme décrit dans le **CHAPITRE 1**, ces facteurs régulent la **maturation endométriale**.

La progestérone induit également des effets cytoplasmiques rapides dits non-génomiques. Plus précisément, les récepteurs PR sont capables de se lier au domaine SH3 (Src homology domain 3) de la **kinase SRC** membranaire, activant ainsi la voie MAPK (Maruyama and Yoshimura, 2008; Wetendorf and DeMayo, 2012). Cette kinase active par phosphorylation les facteurs de transcription STAT3 et STAT5 qui régulent l'expression de gènes impliqués dans l'**angiogenèse** ou la **réponse inflammatoire** de l'endomètre (Seval *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2007; Vinketova *et al.*, 2016).

La **progestérone** est considérée comme l'hormone essentielle lors de l'initiation de la décidualisation (Maruyama and Yoshimura, 2008). Cependant, plusieurs études ont démontré que la progestérone (seule ou complémentée avec les œstrogènes) ne constitue pas un stimulateur fort de la décidualisation (Telgmann *et al.*, 1997; Wetendorf and DeMayo, 2012). Il a ainsi été démontré que la progestérone stimule la production d'**AMP cyclique** (AMPc) dans l'endomètre, suggérant que ce second messager intracellulaire pourrait être impliqué dans le phénomène de décidualisation (Brar *et al.*, 1997; Vinketova *et al.*, 2016). Des études réalisées *in vitro* montrent qu'un traitement des cellules endométriales avec l'AMPc est capable d'induire la décidualisation, même en absence des hormones stéroïdes (œstrogènes ou progestérone) (Brar *et al.*, 1995; Brosens *et al.*, 1999; Teklenburg *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2014). Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans le cross-talk de ces deux voies de signalisation ne sont pas connus à ce jour (Wetendorf and DeMayo, 2012).

Il est clairement établi que l'AMPc conduit à la phosphorylation du facteur de transcription CREB (cAMP response element-binding protein) dans les cellules endométriales, *via* la voie de la PKA (protéine kinase A). CREB se lie à une séquence CRE (cAMP response element) présente dans la région promotrice des gènes cibles de l'AMPc, tels que les gènes codant la prolactine et l'IGFBP-1 (Telgmann *et al.*, 1997; Makrigiannakis *et al.*, 1999; Vinketova *et al.*, 2016). De plus, l'AMPc active *via* la PKA,

les facteurs de transcription FoxO1, C/EBPβ, STAT3 et STAT5 impliqués dans le programme de différenciation des cellules endométriales (Brosens *et al.*, 1999; Vinketova *et al.*, 2016) (**Figure 23**).

### 2. Les facteurs endométriaux

Plusieurs molécules induites au cours de la décidualisation amplifient la voie de signalisation progestérone/AMPc. Il s'agit en particulier de la **relaxine**, de la **prostaglandine E2**, de la **prokinéticine-1** et du **CRF** (Gellersen and Brosens, 2003, 2014; Vinketova *et al.*, 2016). Ces protéines endométriales se lient à des récepteurs couplés aux protéines G capables de stimuler l'adénylate cyclase et d'augmenter les taux intracellulaires d'AMPc. Parallèlement à ce mécanisme, les facteurs endométriaux tels que le **LIF** et les interleukines **IL-6** et **IL-11** exercent une action autocrine positive sur le processus de décidualisation en stimulant directement l'activation des facteurs de transcription STAT3 et STAT5 *via* la voie JAK/STAT (janus kinase/signal transducer and activator of transcription) dans la cellule endométriale (Vinketova *et al.*, 2016).



#### Figure 23. Rôles de la progestérone et de l'AMP cyclique au cours de la décidualisation.

Modifié d'après Vinketova *et al.* 2016. La progestérone initie la décidualisation en se fixant (*via* son récepteur PR) au promoteur des gènes cibles présentant une séquence PRE. Elle augmente également la production d'AMPc qui potentialise les effets de l'hormone. L'AMPc stimule directement la transcription des gènes cibles via le facteur de transcription CREB et indirectement via les facteurs STAT3, STAT5, C/EBPβ et FoxO1. Les gènes cibles exercent un rétrocontrôle positif sur la décidualisation en (1) stimulant la translocation nucléaire des facteurs de transcription STAT3 et STAT5 et en (2) augmentant la production d'AMPc par l'adénylate cyclase.

### 3. Les facteurs trophoblastiques

Au cours de la gestation, l'intégrité de la décidue doit obligatoirement être maintenue afin d'éviter un arrêt prématuré de la grossesse. Les cellules trophoblastiques contribuent à maintenir la décidualisation en sécrétant des facteurs agissant notamment *via* la voie de l'AMPc. Plus précisément, les cellules trophoblastiques produisent la **relaxine** et le **LIF** qui agissent de concert avec les protéines endométriales. Elles sécrètent également l'**hCG** et l'**IL-1** $\beta$  qui favorisent la synthèse de prostaglandine E2 par les cellules endométriales, stimulant ainsi la décidualisation *via* l'accumulation d'AMPc (Gellersen and Brosens, 2014; Bernardini *et al.*, 2015; Vinketova *et al.*, 2016).

#### 4. Les perturbations de la décidualisation

#### Pathologies et décidualisation

Des anomalies de la décidualisation peuvent être à l'origine d'une infertilité ou d'une grossesse pathologique. Plus précisément des anomalies de la décidualisation sont observées dans le cadre de l'**endométriose** (Gellersen and Brosens, 2014). Il a notamment été démontré *in vitro*, que les cellules endométriales issues de femmes endométriosiques présentent des **capacités de décidualisation réduites**. La sécrétion de prolactine et d'IGFBP-1 est fortement diminuée dans ces cellules (Bulun *et al.*, 2006; Klemmt *et al.*, 2006). Ces défauts de la décidualisation sont associés à une sous-expression des gènes codant les récepteurs de la prolactine et de la progestérone (Aghajanova *et al.*, 2011). De plus, une résistance à la progestérone des cellules endométriales de femmes souffrant d'endométriose est parfois observée (Bulun *et al.*, 2006). Une **décidualisation anormale** est également décrite lors de **fausses-couches spontanées**. Cela se traduit notamment par un état pro-inflammatoire prolongé de l'endomètre caractérisé par une production excessive d'IL-33 et une faible expression des marqueurs déciduaux (Gellersen and Brosens, 2014).

#### \* Obésité et décidualisation

L'obésité est fréquemment associée à une hypofertilité. Elle constitue également un facteur de risque de développer un cancer endométrial (Trévoux, 2009). Ces données suggèrent que l'obésité pourrait compromettre la qualité de l'endomètre sain.

• 77 •

Chez des souris obèses à un régime riche en lipides et en glucides, **la décidue est beaucoup moins développée** que chez les souris contrôles. Ce phénomène est associé à de faible taux d'expression de la protéine PRP (prolactin-related protein), un marqueur de décidualisation de l'espèce murine. Cependant, les taux de progestérone ovarienne ne diffèrent pas entre les deux groupes, suggérant que les défauts de décidualisation chez la souris obèse sont dus à des anomalies endométriales et non à des désordres ovariens (Rhee *et al.*, 2016). Les auteurs de ce travail ont également étudié les effets *in vitro* de l'acide palmitique (le composant majeur du régime hyper gras donné aux souris obèses) sur des cellules endométriales humaines. Dans ces conditions, l'expression des gènes codant la prolactine et l'IGFBP-1 est **fortement diminuée** (Rhee *et al.*, 2016).

De manière intéressante, cette étude a également démontré que les cellules endométriales issues de femmes obèses présentent des niveaux d'expression diminués de la prolactine et de l'IGFBP-1, comparativement aux cellules prélevées chez des femmes normo-pondérées (Rhee *et al.*, 2016). D'autre part, l'endomètre des femmes obèses semble plus épais. L'augmentation de l'épaisseur de l'endomètre semble due à une prolifération cellulaire excessive au détriment de la différenciation des cellules déciduales (Serdar Serin *et al.*, 2003). Ces résultats confirment donc que la décidualisation semble être réduite dans le cadre de l'obésité.

### \* Tabac et décidualisation

Il est clairement établi que le comportement de la femme influence la qualité de son système reproducteur. Plus particulièrement, le **tabac** semble être un frein à la fertilité. Cet effet a été observé chez les femmes qui ont recours à l'assistance médicale à la procréation. Au sein de la population fumeuse, les taux de grossesse sont plus faibles que chez les femmes non-fumeuses et les anciennes fumeuses. La communauté scientifique préconise donc l'arrêt du tabac dès la période de conception (Vanvoorhis *et al.*, 1996). Une étude réalisée chez la ratte a également démontré que la **nicotine** dérégule les taux de progestérone et d'œstrogènes, induisant ainsi une diminution de la **décidualisation endométriale** (Siti Norashikin *et al.*, 2014).

#### Perturbations des signaux hormonaux et décidualisation

Ces dernières années, les effets néfastes des **perturbateurs endocriniens** sur l'organisme ont été de plus en plus discutés et décrits. Il s'avère que le mode d'action de ces molécules est le plus souvent associé à une liaison aux récepteurs nucléaires (Trévoux, 2009). La physiologie endométriale dépendant de l'action des œstrogènes et de la progestérone *via* les récepteurs nucléaires ER et PR, elle est donc fortement susceptible d'être altérée en présence de ces ligands. Une étude récente a démontré que de faibles concentrations de **bisphénol A** ou de **triclosan** (deux perturbateurs endocriniens très présents dans les produits alimentaires, industriels ou sanitaires utilisés quotidiennement) induisent une augmentation *in vitro* de la production de prolactine et d'IGFBP-1 par les cellules endométriales humaines. Ces résultats suggèrent que ces perturbateurs miment l'action de la progestérone en activant la voie de l'AMPc et pourraient être à l'origine d'une **décidualisation excessive** (Forte *et al.*, 2016). Cependant, une décidualisation accrue n'est pas nécessairement un bon pronostic de fertilité. En effet, cela peut engendrer un prolongement anormal de la fenêtre implantatoire à l'origine des **échecs d'implantation** dus à une apposition trop tardive et asynchrone de l'embryon à l'endomètre (Farquharson/Stephenson, 2010).

## C. La réceptivité utérine

La réceptivité utérine est directement associée au phénomène de décidualisation. Elle se définit par la fenêtre temporelle selon laquelle l'épithélium luminal endométrial est apte à accueillir un embryon. En effet, en dehors de la « **fenêtre implantatoire** » l'endomètre constitue un environnement non-réceptif, totalement réfractaire à l'embryon. Cette période de réceptivité maximale a lieu au milieu de la phase sécrétoire du cycle menstruel, entre les jours 6 et 12 suivant l'ovulation (Wilcox *et al.*, 1999; Elnashar and Aboul-Enein, 2004).

L'épithélium luminal constitue la partie de l'endomètre qui interagit directement avec le blastocyste au cours de l'implantation embryonnaire. La cellule épithéliale de l'endomètre est une cellule polarisée. Le pôle basal, qui repose sur le stroma utérin, permet le passage de signaux moléculaires en provenance ou en partance de la décidue ou des vaisseaux sanguins. Les membranes latérales des cellules

• 79 •

épithéliales forment des jonctions serrées grâce aux desmosomes qui assurent la cohésion de l'épithélium. Le **pôle apical** intervient plus spécifiquement dans les interactions avec le blastocyste (Merviel *et al.*, 2001). Les cellules épithéliales acquièrent un phénotype réceptif sous l'influence de facteurs moléculaires d'origine ovarienne, déciduale et trophoblastique.

L'état de réceptivité est caractérisé par des modifications morphologiques des cellules épithéliales. Plus précisément, des protrusions de la membrane plasmique appelés **pinopodes**, apparaissant le  $20^{eme}$  jour du cycle menstruel sur le pôle apicale de l'épithélium luminal. L'augmentation de l'expression de molécules favorisant l'adhésion entre le blastocyste et les cellules épithéliales de l'endomètre est également caractéristique de cette phase. Ces molécules appartiennent à quatre grandes familles : les **intégrines**, les **sélectines** et les **immunoglobulines**. Plus particulièrement, les intégrines  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$  et  $\alpha v\beta 3$  constituent les meilleurs marqueurs de la réceptivité utérine (Elnashar and Aboul-Enein, 2004). La L-sélectine, la E-cadhérine et les récepteurs CD44 et CD55 sont également spécifiques de l'endomètre réceptif (Carson *et al.*, 2000; Trévoux, 2009; Salleh and Giribabu, 2014).

La réceptivité utérine se traduit également par une disparition des molécules anti-adhésion telles que les **mucines** (MUC-1 et MUC-16) (Aplin and Ruane, 2017). Les mucines sont des glycoprotéines formant le glycocalyx dont l'expression est très élevée au cours de la période pré-implantatoire. L'adhésion entre le blastocyste et l'endomètre nécessite leur disparition (Elnashar and Aboul-Enein, 2004).

Cependant, les données de la littérature obtenues chez l'espèce humaine sont relativement pauvres. En effet, cette phase est très difficile à étudier *in vivo* et *in vitro*. La majorité des études sont donc réalisées chez la souris ou le rat, deux espèces présentant comme l'espèce humaine, une phase de décidualisation.

### 1. Les hormones ovariennes

L'importance des hormones ovariennes (œstrogènes et progestérone) dans la mise en place de la réceptivité utérine a été démontrée chez des souris ovariectomisées. En effet, l'injection de ces deux molécules chez ces animaux restaure l'acquisition d'un endomètre réceptif (Zhang *et al.*, 2013a). A l'inverse de la progestérone dont le rôle crucial au cours de la maturation endométriale est admis, l'action des œstrogènes fut longtemps controversée. Cependant, le fait que des animaux (ratte et souris)

• 80 •

présentent des problèmes d'implantation embryonnaire malgré une progestéronémie normale suggère que d'autres facteurs interviennent et notamment les œstrogènes. Ainsi, plusieurs études ont démontré que les œstrogènes synthétisées au cours de la période lutéale du cycle ovarien jouent un rôle majeur lors de l'implantation embryonnaire (Zhang *et al.*, 2013a).

## \* La progestérone

La progestérone favorise la mise en place des interactions entre le blastocyste et l'endomètre en induisant directement l'expression de **molécules d'adhésion** telles que l'**intégrine**  $\alpha$ **1**, le récepteur **HB**-**EGF** et la **calcitonine**, au pôle apical des cellules épithéliales (Carson *et al.*, 2000). De plus, la progestérone exerce un rôle paracrine sur la production d'autres molécules d'adhésion. En effet, suite à la liaison à son récepteur PR dans la cellule stromale, la progestérone stimule la production du HB-EGF (heparin-binding epidermal growth factor) et de l'EGF (epidermal growth factor). Ces facteurs de croissance se lient à leur récepteur EGF-R exprimé par les cellules épithéliales. Ils augmentent ainsi l'expression des **intégrines**  $\alpha$ v et  $\beta$ **3** et des récepteurs **CD44** et **CD55** dans les cellules épithéliales (Carson *et al.*, 2000) (**Figure 24**).

D'autre part, la progestérone participe à la mise en place de la réceptivité utérine en inhibant le signal œstrogénique dans l'épithélium luminal. Cet effet est réalisé par l'intermédiaire de la **protéine IHH** (indian hedgehog homolog) (Trévoux, 2009; Large and DeMayo, 2012; Wetendorf and DeMayo, 2012). Cette protéine est totalement spécifique des cellules épithéliales. IHH est cruciale lors de l'implantation embryonnaire. En effet, son invalidation entraîne un échec d'implantation (Raymond, 2009; Gellersen and Brosens, 2014). Des études récentes montrent qu'une fois sécrétée par la cellule épithéliale en réponse à la progestérone, IHH induit l'expression de la protéine **PTCH-1** (patched-1) elle-même activatrice du facteur de transcription **COUP-TFHI** (chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II) dans le compartiment stromal (Large and DeMayo, 2012; Wetendorf and DeMayo, 2012; Strauss *et al.*, 2014). COUP-TFHI stimule l'expression du facteur **HAND2** (heart and neural crest derivatives expressed transcript 2) dans les cellules stromales, qui inhibe la transcription du FGF (fibroblast growth factor). La **protéine FGF** se lie à son récepteur FGF-R exprimé par les cellules épithéliales, activant ainsi la **voie ERK** (extracellular signal-regulated kinase) et la transcription des

récepteurs ER. Ainsi, en inhibant l'expression du FGF, le couple IHH-COUP-TFII inhibe l'expression des ER dans l'épithélium luminal (Wetendorf and DeMayo, 2012; Strauss *et al.*, 2014) (**Figure 24**).

Parallèlement, le facteur de transcription COUP-TFII induit l'expression des gènes *BMP2* (bone morphogenic protein 2) et *WNT4* (wingless-type MMTV integration site family member 4) dans les cellules stromales. Ces protéines stimulent la décidualisation *via* l'activation du facteur de transcription FoxO1 (Trévoux, 2009; Large and DeMayo, 2012; Wetendorf and DeMayo, 2012; Strauss *et al.*, 2014). Le rôle de la progestérone au cours de la maturation endométriale (décidualisation et réceptivité utérine) démontre l'importance du **dialogue** entre les **cellules épithéliales** et les **cellules stromales** de l'endomètre.

#### ✤ Les œstrogènes

Les œstrogènes semblent être impliqués dans la régulation de la **durée de la fenêtre implantatoire**. Les mécanismes moléculaires régulant ce processus sont cependant méconnus à ce jour (Ma *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2013a). Cependant, il a été décrit que de fortes concentrations d'œstrogènes induisent une réduction de la durée de l'état réceptif, rendant ainsi l'endomètre réfractaire à l'implantation (Ma *et al.*, 2003). De même, de forts taux circulants de cette hormone peuvent être à l'origine d'une implantation différée et asynchrone, augmentant les risques d'arrêt prématuré de la grossesse (Farquharson/Stephenson, 2010; Large and DeMayo, 2012; Zhang *et al.*, 2013a).

Les œstrogènes participent directement à la mise en place de la réceptivité endométriale en exercant un **rôle prolifératif** direct *via* les ER dans les cellules épithéliales. Enfin, les œstrogènes stimulent l'expression de la **mucine-1** (MUC-1), une glycoprotéine du glycocalyx qui empêche les interactions trophoblaste-endomètre. Cependant, au cours de la phase sécrétoire, la progestérone inhibe le signal œstrogénique (*via* l'inhibition de l'expression des ER) dans l'épithélium luminal. Ainsi, l'épaisseur du glycocalyx se réduit pour favoriser l'adhésion du blastocyste (Selcer and Leavitt, 1988; Wetendorf and DeMayo, 2012) (**Figure 24**). Les mécanismes moléculaires **génomiques** et **non-génomiques** réalisés par les œstrogènes au cours de la phase proliférative du cycle menstruel sont décrits dans la **partie C** du **CHAPITRE 1**.

Parallèlement à ces effets sur les cellules épithéliales, les œstrogènes participent indirectement à l'établissement des phases d'apposition et d'adhésion en agissant sur l'embryon. En effet, il a été montré que les œstrogènes sont nécessaires à l'acquisition de l'état de compétence embryonnaire. Ce phénomène se traduit par une **activation du génome du blastocyste** (Paria *et al.*, 1993; Trévoux, 2009; Zhang *et al.*, 2013a). Chez certaines espèces comme la souris par exemple, cette activation s'effectue *via* les œstrogènes d'origine maternelle. Chez d'autres (le cochon d'Inde, le hamster, le lapin ou encore le singe rhésus), les œstrogènes sont d'origine embryonnaire. Dans ce cas, les embryons possèdent une activité aromatase permettant une synthèse œstrogénique locale (Zhang *et al.*, 2013a).



**Figure 24. Rôle de la progestérone dans le dialogue entre le compartiment stromal et épithélial.** Modifié d'après Wetendorf *et al.* 2012. La progestérone participe à la mise en place de la réceptivité utérine en induisant l'expression de molécules d'adhésion au pôle apical des cellules épithéliales. Cette action peut être (1) directe ou (2) indirecte *via* l'activation des facteurs HB-EGF et EGF dans le stroma utérin. Parallèlement, la progestérone stimule le couple IHH-COUP-TFII qui inhibe le signal œstrogénique réduisant ainsi la prolifération cellulaire épithéliale et l'expression de la mucine-1.

## 2. Le LIF

La sécrétion endométriale du facteur LIF présente un pic au cours de la **période péri-implantatoire** (Wetendorf and DeMayo, 2012; Vinketova *et al.*, 2016). Cette cinétique particulière suggère fortement que le LIF joue un rôle essentiel au cours de l'acquisition de la réceptivité utérine. Le rôle précis du LIF au cours de l'implantation embryonnaire a été décrit dans le modèle de souris LIF  $\leftarrow$ . Dans ce modèle, l'embryon s'appose à l'épithélium mais ne crée pas d'interactions. Les auteurs montrent que l'épithélium utérin est dépourvu de **pinopodes** et présente un **glycocalyx** encore très développé (Trévoux, 2009). Le LIF induit également la production de différentes **molécules d'adhésion** telles que le facteur HB-EGF, les intégrines  $\alpha v$  et  $\beta$ 3, la E-cadhérine, la L-séléctine, l'épiréguline, l'amphiréguline, la trophinine ou encore la protéine JAM (junctional adhesion molecule) dans les cellules épithéliales (Trévoux, 2009; Salleh and Giribabu, 2014). Ces molécules interagissent avec celles présentes à la surface des cellules trophoblastiques (trophinine, CD44, intégrines  $\alpha \beta$ 1 et  $\alpha v \beta$ 5, laminine, fibronectine...) et établissent ainsi des **contacts cellulaires** étroits entre l'embryon et l'endomètre, nécessaires à l'implantation embryonnaire (Merviel *et al.*, 2001; Trévoux, 2009). Des études récentes ont mis en évidence que ces effets du LIF dans les cellules épithéliales endométriales sont réalisés par diverses voies de signalisation dont la **voie ERK**, la **voie PI3K** et la **voie JAK/STAT** (Trévoux, 2009).

# D. L'invasion trophoblastique

L'invasion trophoblastique constitue la phase finale de l'implantation embryonnaire. Elle est réalisée par les cellules trophoblastiques extravilleuses et ne semble pas dépendre de la décidue. En effet, les cytotrophoblastes extravilleux sont capables de s'implanter en dehors de ce tissu, par exemple dans les trompes de Fallope ou même dans le péritoine et être ainsi à l'origine d'une grossesse extra-utérine (Ali and Fitzgerald, 2006; Evain-Brion and Malassiné, 2011). Cependant, la décidue joue un rôle majeur dans le **contrôle de ce processus invasif**. En effet, au cours de la maturation endométriale et de l'implantation embryonnaire, la matrice extracellulaire (MEC) du stroma utérin subit un important remodelage résultant du dialogue entre les cellules déciduales, les cellules immunitaires, les cellules vasculaires et les cellules trophoblastiques (Trévoux, 2009). Ces mécanismes moléculaires entre ces

différentes populations cellulaires permettent une **invasion trophoblastique limitée** dans le temps (entre la 8<sup>ème</sup> et la 18<sup>ème</sup> semaine de grossesse) et dans l'espace (jusqu'au premier tiers du myomètre) (Zhu *et al.*, 2012). Une dérégulation de l'ensemble des mécanismes impliqués dans le contrôle de l'invasion trophoblastique sera à l'origine d'une **grossesse pathologique** associée à une **invasion insuffisante** (pré-éclampsie, retard de croissance *in utero*, avortement spontané) ou à l'inverse à une **invasion excessive** (placenta accreta, choriocarcinome) (Lala *et al.*, 2002; Anin *et al.*, 2004; Ball *et al.*, 2006; Kadyrov *et al.*, 2006).

#### 1. Les acteurs moléculaires de l'invasion

Plusieurs familles de molécules impliquées dans le processus invasifs ont été identifiées. Il s'agit d'enzymes protéolytiques dont le rôle est essentiel dans la réorganisation de la MEC (Merviel *et al.*, 2001; Trévoux, 2009; Zhu *et al.*, 2012) Les principales familles enzymatiques sont décrites dans le Tableau 5.

FAMILLES	ENZYMES	PRINCIPAUX SUBSTRATS	
Cystéine	Cathepsine B	Protéoglycanes, Collagène I	
	Cathepsine 1	Protéoglycanes, Collagène I, Fibronectine	
	Enzyme de conversion IL-1β	Précurseur de l'IL-1β	
Sérine	Activateur du plasminogène	Fibronectine, Plasminogène	
	Kallikréine	Pro-enzymes (pro-MMP-1 et pro-MMP-8)	
	Tryptase	Pro-enzymes (pro-MMP-3), Collagène VI	
	Elastase leucocytaire	Fibronectine, Elastine	
Zinc	Métalloprotéases	cf. Tableau 6	
	Famille ADAM	Cadhérines, Sélectines, Intégrines, CD44	

Tableau 5. Enzymes essentielles au cours de l'implantation embryonnaire.

### ✤ Les MMP (métalloprotéases)

Les **MMP** appartiennent à la famille des endopeptidases zinc-dépendantes et sont classées en fonction de leur localisation cellulaire (sécrétées ou liées à la membrane plasmique). Elles peuvent également être catégorisées suivant leur activité enzymatique (gélatinases, collagénases, stromélysines, matrilysines). Cependant, la relation enzyme-substrat n'est pas stricte et une même MMP peut se lier à

différentes molécules (Merviel *et al.*, 2001) (Tableau 6). Les MMP sont synthétisées sous forme d'enzymes inactives appelées pro-MMP composées de plusieurs domaines protéiques. Un **peptide signal** permet la translocation des MMP dans le réticulum endoplasmique où elles intègrent la voie sécrétoire. Un **domaine PRO**, caractéristique du pro-peptide, bloque l'activité du **domaine catalytique**. Suite à la liaison d'un ion Zn<sup>2+</sup>, la séquence PRO est clivée, libérant la forme active de l'enzyme. Un **domaine hémopexine** situé à l'extrémité C-terminale confère à l'enzyme sa spécificité biologique en lui permettant de se lier à ses différents substrats. Ce domaine régule également l'activité de l'enzyme en interagissant avec des inhibiteurs spécifiques appelés TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases). Enfin, certaines MMP présentent un **domaine transmembranaire** leur permettant de se lier à la membrane plasmique (Bourboulia and Stetler-Stevenson, 2010) (**Figure 25**).





Modifié d'après Ricci *et al.* 2015. Le domaine PRO caractéristique des pro-MMP est situé à l'extrémité Nterminale. Son clivage induit l'activation de l'enzyme, suite à la liaison d'un ion  $Zn^{2+}$  sur le domaine catalytique. Le domaine hémopexine permet à l'enzyme de se lier à différents substrats. Il régule également l'activité de l'enzyme en fixant les inhibiteurs TIMP. Le domaine TM est spécifique des MMP transmembranaires.

L'activation des MMP est réalisée par de nombreuses protéases extracellulaires telles que la **tryptase** ou la **kallikréine** (comme décrit dans le **Tableau 5**). Certaines sont activées par d'autres MMP. Par exemple, MMP-2 peut être activée par les MMP-7,-13,-14,-15,-16,-25 (Merviel *et al.*, 2001). Parallèlement, l'activité des MMP est régulée par leurs inhibiteurs, les **TIMP**. Quatre isoformes ont été décrites (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4). Les TIMP interagissent directement avec l'enzyme empêchant ainsi la liaison de l'ion Zn<sup>2+</sup> (Khoury *et al.*, 2006; Bourboulia and Stetler-Stevenson, 2010). Chaque TIMP peut contrôler la majorité des MMP bien que TIMP-2 et TIMP-3 possèdent le spectre d'inhibition le plus large, leur permettant d'inhiber l'activité de l'ensemble des MMP. En revanche, TIMP-1 possède peu d'affinité pour les MMP membranaires telles que MMP-14,-15,-16,-17,-24,-25 (Brew and Nagase, 2010). A ce jour, 23 enzymes appartenant à la famille des MMP ont été décrites chez l'Homme (**Tableau 6**). Elles sont impliquées dans la **réorganisation de la MEC**, l'**adhésion** et l'**invasion cellulaires**, mais également dans les processus d'**inflammation** et d'**apoptose** (Chowdhury *et al.*, 2016).

ENZYMES	PRINCIPAUX SUBSTRATS	
MMP-1	Collagène I, II, III, VII, VIII, X, Gélatine, Protéoglycanes, L-séléctine, IGFBP-3	
MMP-2	Collagène I, IV, V, VII, X, Gélatine, Elastine, Fibronectine, pro-MMP-9,-13	
MMP-3	Collagène III, IV, V, IX, X, Gélatine, Elastine, Fibronectine, pro-MMP-1,-7,-8,-9	
MMP-7	Collagène IV, X, Gélatine, Fibronectine, Laminine, Plasminogène, pro-MMP-2,-9	
MMP-8	Collagène I, II, III, V, VIII, X, Gélatine, Elastine, Fibronectine, Protéoglycanes	
MMP-9	Collagène IV, V, VII, X, Gélatine, Elastine, Fibronectine, Protéoglycanes, IL-1β	
MMP-10	Collagène IV, V, IX, X, Gélatine, Elastine, Fibronectine, pro-MMP-1,-8	
MMP-11	IGFBP-1, α1-antitrypsine-inhibiteur, α2-antiplasmine	
MMP-12	Collagène IV, Gélatine, Elastine, Laminine, a1-antitrypsine-inhibiteur, pro-TNF	
MMP-13	Collagène I, II, III, IV, IX, X, Gélatine, Fibronectine, Laminine, pro-MMP-2,-9	
MMP-14	Collagène I, II, III, VII, VIII, X, Gélatine, Elastine, Fibronectine, pro-MMP-2,-13	
MMP-15	Gélatine, Fibronectine, Laminine, pro-MMP-2	
MMP-16	Collagène III, Fibronectine, pro-MMP-2	
MMP-17	Fibrine	
MMP-19	Collagène IV, Gélatine, Fibronectine, Laminine	
MMP-20	Amélogenine, Protéoglycanes	
MMP-21	α1-antitrypsine	
MMP-23	-	
MMP-24	N-cadhérine	
MMP-25	pro-MMP-2	
MMP-26	Collagène IV, Gélatine, Fibronectine	
MMP-27	Collagènes, Gélatine, Fibronectine, Laminine	
MMP-28	-	

Tableau 6. Les MMP et leurs principaux substrats.

A l'interface fœto-maternelle, les cellules trophoblastiques et déciduales sécrètent de nombreuses MMP, notamment les isoformes **MMP-2** et **MMP-9** qui semblent être les formes majoritaires dans les deux types cellulaires (Staun-Ram *et al.*, 2004; Tapia-Pizarro *et al.*, 2013). Elles sont toutes les deux capables de dégrader le collagène de type IV qui forme le principal constituant de la MEC et facilitent ainsi l'invasion trophoblastique par les cellules extravilleuses (Staun-Ram *et al.*, 2004). L'activité de ces

MMP est contrôlée de manière autocrine et paracrine par le placenta et la décidue qui sécrètent les isoformes **TIMP-1**, **TIMP-2** et **TIMP-3** (Krenzer *et al.*, 2006; Paiva *et al.*, 2009).

## ✤ <u>La plasmine</u>

Au cours de l'invasion trophoblastique, la plasmine joue un rôle essentiel dans la réorganisation de la MEC. L'activité de la plasmine est elle-même régulée par un système enzymatique, le système activateur du plasminogène de type urokinase. Le pro-uPA (urokinase plasminogen activator) se lie à son récepteur uPA-R et active la voie ERK. Cette kinase induit le clivage et l'activation de l'uPA. L'uPA se lie ensuite au plasminogène qui est converti en plasmine. Cette enzyme posséde une activité protéase. Ainsi, la plasmine participe directement à l'invasion trophoblastique en induisant la dégradation de nombreuses protéines de la MEC. Elle intervient également indirectement en activant certaines MMP telles que MMP-1,-2,-9. Le système uPA/uPA-R est exprimé dans les cellules trophoblastiques et les cellules déciduales (Nordengren *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2012). Il est directement régulé par deux inhibiteurs qui lui sont spécifiques, PAI-1 et PAI-2 (plasminogen activator inhibitors 1 and 2) qui empêche la liaison uPA/uPA-R et donc la conversion du plasminogène en plasmine (Figure 26). Ainsi, des taux anormaux de PAI sont associées à des pathologies de la grossesse liées à une invasion déficiente telle que la pré-éclampsie et les avortements spontanés (Zhu *et al.*, 2012).





En se fixant à son récepteur, la protéine uPA est activée. Cette enzyme permet le clivage du plasminogène en plasmine. Par son activité protéase, la plasmine contribue directement ou indirectement *via* l'activation des MMP, à la réorganisation de la MEC endométriale.

#### ✤ La famille ADAM (A disintegrin and metalloproteinase)

Comme les MMP, les protéines constituant la famille ADAM sont des protéases zinc-dépendantes. A ce jour, 21 membres ont été décrits chez l'Homme. La moitié possède une activité protéolytique de type métalloprotéase. Les protéines ADAM régulent de nombreux processus physiologiques, notamment lors de la fécondation et du développement embryonnaire. Elles sont également impliquées dans l'inflammation et la cancérogenèse. Les protéines ADAM sont majoritairement transmembranaires. Elles induisent le clivage d'autres protéines localisées dans la membrane plasmique, telles que la Ecadhérine, la L-séléctine, le récepteur CD44 ou la protéine VAM (vascular adhesion molecule). Ainsi, les protéines ADAM régulent l'adhésion et l'invasion cellulaires (Pollheimer et al., 2014). Leur activité est régulée par les TIMP, notamment par TIMP-3 qui inhibe la majorité des protéines de cette famille (Bourboulia and Stetler-Stevenson, 2010). A l'interface fœto-maternelle, les protéines ADAM sont sécrétées par les cellules trophoblastiques et les cellules déciduales (Laigaard et al., 2005; Zhu et al., 2006; Cowans and Spencer, 2007; Pollheimer et al., 2014). Plusieurs études suggèrent que la protéine ADAM12 joue un rôle important au cours de l'invasion trophoblastique. Cette protéine existe sous deux formes. La forme membranaire longue ADAM12L induit le clivage du facteur pro-HB-EGF en HB-EGF. Ce facteur de croissance est décrit pour ses propriétés pro-invasives dans les cellules trophoblastiques extravilleuses via le récepteur EGF-R et la voie de signalisation PI3K. La forme courte sécrétée ADAM12S cible les protéines IGFBP-3 et IGFBP-5 régulant ainsi l'activité des facteurs IGF-1 et IGF-2. Ces derniers sont des activateurs majeurs de l'invasion trophoblastique (Laigaard et al., 2005; Pollheimer et al., 2014). En effet, une diminution des taux de la protéine ADAM12S est corrélée à la survenue de pathologies associées à une faible invasion telle que la pré-éclampsie et le retard de croissance intra-utérin (Laigaard et al., 2005; Cowans and Spencer, 2007).

Le rôle des protéines **ADAM8**, **ADAM19** et **ADAM28** au cours de l'invasion trophoblastique a également été suggéré. En effet, les protéines ADAM19 et ADAM28 ciblent les intégrines exprimées à la surface des cytotrophoblastes invasifs tels que l'intégrine  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 et la protéine ADAM8 clive préférentiellement la L-séléctine. Par ces actions, les protéines ADAM stimulent l'invasion trophoblastique (Pollheimer *et al.*, 2014).

La régulation du processus d'invasion trophoblastique est un phénomène complexe. En effet, les différentes enzymes décrites précédemment sont produites à la fois par les cellules extravilleuses mais aussi par les cellules déciduales. Ainsi, les **hormones**, **facteurs de croissance** et **cytokines** contrôlant l'invasion peuvent agir sur un seul type cellulaire, ou sur les deux types cellulaires, de manière synchrone ou non. Une régulation correcte du système MMP/TIMP est indispensable à une invasion trophoblastique réussie (Burrows *et al.*, 1996; Huppertz *et al.*, 1998; Merviel *et al.*, 2001; Trévoux, 2009; Evain-Brion and Malassiné, 2011; Nissi *et al.*, 2013).

#### 2. Les hormones placentaires

### \* La progestérone

Lors de la maturation endométriale, la progestérone synthétisée par le corps jaune participe au remodelage du stroma utérin en favorisant la synthèse de protéines constituant la MEC (laminine, fibronectine, collagène) par les cellules déciduales (Benirschke *et al.*, 2012). Plus tard, la progestérone placentaire exerce un **effet anti-invasif dans l'endomètre** en stimulant la production de l'inhibiteur PAI-1 par les cellules déciduales. Parallèlement, la progestérone réduit l'expression de plusieurs isoformes de MMP endométriales telles que MMP-1, MMP-2, MMP-3 et MMP-9 (Zhu *et al.*, 2012). De plus, la progesterone **inhibe la production des enzymes placentaires pro-invasives** uPA, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7 et MMP-9 dans les cellules trophoblastiques extravilleuses. Enfin, elle induit l'expression des inhibiteurs PAI-1 et TIMP-3 (Halasz and Szekeres-Bartho, 2013). En conclusion, la progestérone freine l'invasion en contrôlant l'expression des protéases à la fois dans les cellules endométriales et les cellules trophoblastiques.

#### L'hCG (hormone chorionique gonadotrope)

Comme décrit dans le **CHAPITRE 1**, les cellules trophoblastiques produisent deux formes d'hCG. Le syncytiotrophoblaste produit une hCG qui ne semble avoir aucun effet sur l'invasion trophoblastique. En revanche, la forme hyperglycosylée (h-hCG) sécrétée par les cellules trophoblastiques extravilleuses exerce un **effet pro-invasif autocrine sur les cellules placentaires** (Handschuh *et al.*, 2007). En effet, l'expression du facteur pro-invasif IGF-2 dans des cellules trophoblastiques humaines cultivées en

présence d'hCG est augmentée, suite à l'activation de la voie ERK et de la voie PI3K. Une autre étude montré que cette hormone stimule l'activité des enzymes MMP-2 et MMP-9 dans ce même type cellulaire (Prast *et al.*, 2008). De manière très intéressante, l'hCG exerce un effet totalement opposé dans l'endomètre. En effet, elle induit une **action anti-invasive dans les cellules stromales** en augmentant l'expression de la protéine TIMP-1 et en diminuant l'expression et l'activité de MMP-2 (Tapia-Pizarro *et al.*, 2013).

### Le GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone)

Le placenta (notamment les cellules extravilleuses et le syncytiotrophoblaste) est capable de produire différents neuropeptides, dont le GnRH, au cours du premier trimestre de grossesse (Evain-Brion and Malassiné, 2011). Le GnRH placentaire agit alors de manière auto/paracrine au cours de l'invasion trophoblastique. Ainsi, il exerce un **effet pro-invasif sur les cellules extravilleuses** en induisant l'expression des enzymes uPA, MMP-2 et MMP-9. En revanche, le GnRH diminue l'expression des inhibiteurs PAI-1 et TIMP-1 dans ces mêmes cellules (Chou *et al.*, 2002, 2003). Ces effets sont associés à l'activation des voies ERK et JNK (jun N-terminal kinase) (Liu *et al.*, 2009). Le GnRH exerce également un **effet pro-invasif dans l'endomètre** où il augmente l'expression et l'activité des MMP-2 et MMP-9 spécifiquement, *via* les voies ERK et JNK (Wu *et al.*, 2015).

## ✤ <u>La leptine</u>

La leptine sécrétée par le syncytiotrophoblaste exerce un **effet paracrine pro-invasif dans le placenta**. Elle induit notamment l'expression de l'enzyme MMP-14 *via* la voie Notch et la voie PI3K dans les cellules extravilleuses humaines (Wang *et al.*, 2014). Une autre étude a démontré que la leptine augmente l'expression et l'activité des enzymes MMP-2 et MMP-9 dans ces mêmes cellules (Castellucci *et al.*, 2000).

### ✤ <u>Le PIF (preimplantation factor)</u>

Le PIF est un peptide sécrété par les cellules trophoblastiques des embryons viables exclusivement. Il présente des propriétés inflammatoires et immunomodulatrices laissant supposer un rôle important au cours de l'implantation embryonnaire. Une étude récente a révélé que le PIF est essentiellement présent dans le placenta de premier trimestre. Son expression est croissante et atteint un pic au cours de la 12<sup>ème</sup>

• 91 •

semaine de grossesse puis chute progressivement jusqu'au terme. Son expression est essentiellement localisée au sein des cellules trophoblastiques extravilleuses. Le PIF exerce un **effet pro-invasif** dans ce type cellulaire, en augmentant l'activité de MMP-9 et en diminuant l'expression de TIMP-1. Cette action semble être associée à l'activation de différentes voies de signalisation dont la voie MAPK, la voie PI3K et la voie JAK/STAT (Moindjie *et al.*, 2014).

#### 3. Les cytokines

### ✤ <u>Le LIF (leukemia inhibitory factor)</u>

Sécrété à la fois par les cellules endométriales et les cellules placentaires, le LIF exerce un **effet proinvasif dans les cellules extravilleuses**. Il induit notamment l'expression du récepteur uPA-R et de l'enzyme MMP-2 (Zheng *et al.*, 2016). L'augmentation des capacités invasives des cellules trophoblastiques semble être réalisée *via* la voie PI3K (Liu *et al.*, 2014).

## \* <u>Le TNF-α (tumor necrosis factor alpha)</u>

Le TNF-α **limite l'invasion trophoblastique dans le placenta** humain. Plus précisément, il augmente l'expression de l'inhibiteur PAI-1 dans les cellules trophoblastiques extravilleuses issues de placenta de premier trimestre et dans les cellules de la lignée HTR-8/SVneo (Bauer *et al.*, 2004; Huber *et al.*, 2006). En revanche, le TNF-α **facilite l'invasion trophoblastique dans l'endomètre** en régulant la balance MMP-1/TIMP-1,-2 spécifiquement (Gottschalk *et al.*, 2000).

#### ✤ <u>Les interleukines</u>

Les interleukines présentes à l'interface fœto-maternelle influencent l'invasion trophoblastique. Elles ont une origine multiple, provenant des cellules déciduales, des cellules trophoblastiques et des cellules immunitaires. D'une manière générale, les interleukines **pro-inflammatoires** (IL-1, IL-6, IL-11, IL-15) **stimulent l'invasion** alors que les interleukines **anti-inflammatoires** (IL-4, IL-10, IL-13) sont **inhibitrices**. Elles agissent essentiellement en contrôlant l'expression et l'activité des métalloprotéases MMP-2 et MMP-9 et en régulant l'expression du système activateur du plasminogène (Staun-Ram and Shalev, 2005; Trévoux, 2009).

### 4. Les facteurs de croissance

#### ✤ <u>L'IGF-2 (insulin-like growth factor)</u>

Le facteur IGF-2 produit par les cellules trophoblastiques active la voie ERK et **induit l'invasion cellulaire** en se fixant à son récepteur présent dans ces cellules (Knöfler, 2010). L'IGF-2 a notamment été décrit pour stimuler l'activité de MMP-2 et MMP-9 (Sandra and Sanchez-Gomez, 1982). Son action pro-invasive peut être contrôlée par les protéines IGFBP (IGFBP-1,-3,-3) sécrétées par la décidue. En effet, en se fixant à IGF-2, les protéines IGFBP préviennent la liaison du facteur de croissance à son récepteur, l'empêchant ainsi d'exercer ses effets pro-invasifs (Irwin *et al.*, 1999).

### ✤ <u>L'EGF (epidermal growth factor)</u>

Produit par l'endomètre et le placenta, l'EGF induit un **signal pro-invasif** en se fixant à son récepteur présent à la surface des cellules trophoblastiques. Il stimule notamment l'activité des métalloprotéases MMP-2 et MMP-9 et de la protéine uPA (Staun-Ram and Shalev, 2005).

#### Le TGF-β (transforming growth factor)

Le TGF- $\beta$  synthétisé par la décidue et le trophoblaste, **inhibe l'invasion trophoblastique** en induisant l'expression de TIMP-1 et TIMP-2 dans les cellules extravilleuses (Graham *et al.*, 1994). Une autre étude a révélé que le traitement de ces mêmes cellules par le TGF- $\beta$  diminue l'expression de MMP-9 et de la protéine uPA (Lash *et al.*, 2005). D'autre part, des taux élevés de TGF- $\beta$  dans la circulation maternelle sont associés à la survenue de la pré-éclampsie (Staun-Ram and Shalev, 2005).

## E. La croissance fœtale

La croissance fœtale est un processus hautement régulé à l'échelle placentaire. Le placenta contrôle en effet l'apport nutritionnel de la mère vers le fœtus. Cet apport nutritionnel dépend essentiellement de (i) la **surface d'échange**, (ii) la **régulation de la balance prolifération/apoptose** et (iii) l'**abondance** et de l'**efficacité des transporteurs de nutriments** présents dans les cellules trophoblastiques (Évain-Brion, 2012).

## 1. La surface d'échange placentaire

Au cours de la grossesse, le placenta subit de nombreuses modifications afin de répondre aux besoins du fœtus. Ainsi, le diamètre, le poids, le débit sanguin et la surface villositaire du placenta augmentent progressivement jusqu'au terme (Benirschke and Kaufmann, 1990; Evain-Brion and Malassiné, 2011; Park *et al.*, 2013; Burton and Fowden, 2015; Warwick, 2015) (**Tableau 7**).

	Premier trimestre	Deuxième trimestre	Troisième trimestre
Diamètre (cm)	6	9	19
Poids (g)	65	210	470
Débit (ml/min)	100	650	900
Surface (m <sup>2</sup> )	0.5	3	12

Tableau 7. Evolution des différents paramètres placentaires au cours de la grossesse humaine.

Il est également démontré que ces différents paramètres peuvent être modifiés dans le contexte de pathologies de la croissance fœtale. Par exemple, le **poids** et le **diamètre** du placenta sont augmentés dès le premier trimestre de grossesse lors de la survenue d'une macrosomie (Schwartz *et al.*, 2014). De la même manière, la **surface** de la zone villositaire est réduite au sein des placentas issus de nourrissons présentant un retard de croissance intra-utérin (Biswas *et al.*, 2008). Le poids et le diamètre placentaires sont également diminués au cours de ces grossesses (Kim *et al.*, 2014).

La surface d'échange placentaire est constituée par le syncytiotrophoblaste dont le renouvellement est réalisé par les mécanismes de **prolifération**, **différenciation** et **apoptose**. Au cours de ce processus, les cytotrophoblastes prolifèrent intensément, puis une partie des cellules sort du cycle cellulaire et se différencient par fusion, aboutissant à la formation d'un syncytium. Les noyaux syncytiaux les plus anciens sont alors éliminés par apoptose et remplacés par les noyaux des cellules nouvellement fusionnées (Huppertz and Kingdom, 2004) (**Figure 27**).



Figure 27. Homéostasie cellulaire de la lignée trophoblastique villeuse.

Modifié d'après Huppertz *et al.* 2004. Le développement de la surface placentaire est assuré par la prolifération cellulaire intense des cytotrophoblastes villeux (1). Puis, certaines cellules sortent du cycle et commencent à se différencier (2) jusqu'à fusion complète avec le syncytiotrophoblaste adjacent. Les noyaux rejoignent alors les zones nucléées du tissu (3). Parallèlement, les noyaux les plus anciens sont éliminés par apoptose et libérés dans la chambre intervilleuse (4).

## 2. L'apoptose trophoblastique

La balance prolifération/apoptose contribue à maintenir une physiologie placentaire saine pour la croissance du fœtus. Des désordres peuvent apparaître lorsque l'apoptose trophoblastique est non contrôlée. C'est notamment l'une des causes du **retard de croissance intra-utérin** où la **mort cellulaire est augmentée** (Straszewski-Chavez *et al.*, 2005; Sharp *et al.*, 2010). A l'inverse dans le cas de la **macrosomie**, l'**apoptose trophoblastique semble déficiente** (Belkacemi *et al.*, 2013; Magee *et al.*, 2014).

Les deux voies apoptotiques (extrinsèque et intrinsèque) décrites dans la littérature sont observées dans les cellules trophoblastiques. La **voie extrinsèque** est dépendante de différents récepteurs de morts exprimés dans la membrane plasmique. La **voie intrinsèque** fait intervenir la mitochondrie qui induit l'expression de différents gènes pro-apoptotiques suite à divers stress cellulaires (stress oxydatif, dommages irréversibles de l'ADN, hypoxie...) (Straszewski-Chavez *et al.*, 2005) (**Figure 28**).

#### \* <u>La voie extrinsèque</u>

Différents récepteurs de mort et leurs ligands sont exprimés à la surface des cellules trophoblastiques, en particulier dans la lignée villeuse. Plus précisément, les couples **TNF-R/TNF-** $\alpha$  (tumor necrosis factor-receptor/tumor necrosis factor  $\alpha$ ), **TRAIL-R/TRAIL** (TNF-related apoptosis-inducing ligand

• 95 •

receptor/TNF-related apoptosis-inducing ligand) et **Fas/Fas-ligand** sont présents à la surface de la membrane microvillositaire. La liaison récepteur/ligand induit le recrutement de la **protéine FADD** (Fas-associated death domain) au domaine de mort intracellulaire du récepteur. Cette interaction stimule l'activation, par clivage, de la caspase-8 et de la caspase-10, deux **caspases initiatrices** qui activent à leur tour les différentes **caspases effectrices** (caspase-3, caspase-6 et caspase-7). Ces caspases conduisent à la mort cellulaire par l'induction de différents effecteurs responsables de la fragmentation de l'ADN, de la dégradation du cytosquelette et des protéines cellulaires. Les produits de la dégradation sont éliminés dans les **corps apoptotiques** qui sont ensuite phagocytés par les macrophages (Straszewski-Chavez *et al.*, 2005).

### \* <u>La voie intrinsèque</u>

Suite à différents stress cellulaires responsables de l'activation de la protéine **p53**, l'expression des gènes pro-apoptotiques *BAX* (BCL-2 associated X) et *BAK* (BCL-2 homologous antagonist killer) est augmentée. L'expression de ces deux gènes peut également être stimulée par la caspase-8 de la voie extrinsèque. Les protéines BAX et BAK entraînent alors la perméabilisation de la membrane mitochondriale libérant de nombreux facteurs pro-apoptotiques et notamment le **cytochrome C** (Straszewski-Chavez *et al.*, 2005; Ichim and Tait, 2016). En s'assemblant à la protéine **APAF-1** (apoptotic protease activating factor-1) et à la pro-caspase-9, le cytochrome C forme un complexe protéique appelé **apoptosome** permettant d'activer la caspase-9, une **caspase initiatrice**. Celle-ci induit les **caspases effectrices** (caspase-3, caspase-6 et caspase-7) rejoignant ainsi la voie extrinsèque (Straszewski-Chavez *et al.*, 2005).



Figure 28. Induction de l'apoptose de la cellule trophoblastique.

Dans les cellules trophoblastiques, l'apoptose est induite selon les deux voies classiques. La voie extrinsèque est activée suite à la liaison d'un ligand de mort à son récepteur spécifique. Ce récepteur présente un domaine de mort permettant d'activer les caspases-8,-10 initiatrices. Celles-ci peuvent activer les caspases-3,-6,-7 effectrices et l'expression des gènes pro-apoptotiques BAX et BAK. Ces gènes sont également induits lors de la voie intrinsèque, suite à un stimulus cellulaire. Ils induisent la libération du cytochrome C, activateur de la caspase-9 initiatrice. Cette caspase stimule l'activation des caspases-3,-6,-7 effectrices. Les deux voies de l'apoptose se rejoignent et induisent la mort cellulaire par fragmentation de l'ADN, dégradation des protéines cellulaires et formation des corps apoptotiques.

## \* <u>Régulation de l'apoptose trophoblastique</u>

- Les **protéines FLIP** (flice-like inhibitory protein) sont des inhibiteurs de l'apoptose dont la structure est proche de celle de la procaspase-8. Dans le placenta, deux isoformes ont été mises en évidence, une forme longue appelée FLIP<sub>L</sub> (FLIP long) et une forme courte appelée **FLIP**<sub>S</sub> (FLIP short). La protéine FLIP<sub>S</sub> est l'inhibiteur le plus efficace. Elle empêche l'activation de la caspase-8 et le déroulement des évènements intracellulaires conduisant à l'apoptose. Il a notamment été observé qu'une augmentation de la production de FLIP<sub>s</sub> dans les cellules trophoblastiques limite l'apoptose induite par la voie Fas (Straszewski-Chavez *et al.*, 2005).

- La famille BCL-2 (B-cell lymphoma 2) est constituée de trois groupes de protéines exerçant un rôle pro-apoptotique ou anti-apoptotique. Le premier groupe se compose de protéines présentant quatre domaines BH (BCL-2 homology) (BH-1 à BH-4). Il regroupe notamment les protéines BCL-2 et BCL-XL. Ces protéines exercent un rôle anti-apoptotique en régulant la libération du cytochrome C par la mitochondrie. Les membres du deuxième groupe se caractérisent par les protéines ne présentant pas de domaine BH-4, leur conférant ainsi une action pro-apoptotique. C'est notamment le cas de BAX et BAK décrits précédemment. Les protéines du troisième groupe (BID et BIK) ne possèdent que le domaine BH-3 et exercent elles aussi une action pro-apoptotique suite à l'induction de l'expression des protéines BAX et BAK et à l'inhibition de la fonction des protéines BCL-2 et BCL-XL auxquelles elles se lient (Straszewski-Chavez *et al.*, 2005).

- Les **protéines IAP** (inhibitors of apoptosis proteins) sont capables d'inhiber à la fois la voie intrinsèque et la voie extrinsèque de l'apoptose. Elles regroupent plusieurs protéines (livine, survivine, apollon, ILP-2, c-IAP...) possédant des domaines BIR (baculoviral IAP repeat) leur permettant d'inhiber l'action des capases initiatrices (caspase-8 et caspase-9) et des caspases effectrices (caspase-3 et caspase-7) (Straszewski-Chavez *et al.*, 2005).

- Les inhibiteurs des IAP exercent une action pro-apoptotique en empêchant les IAP d'exercer leur effet biologique. Ils regroupent les protéines mitochondriales SMAC (second mitochondria-derived activator of caspase) et HTRA2 (high-temperature requirement protein A2) et le facteur nucléaire XAF1 (XIAP-associated factor 1). Ces facteurs pro-apoptotiques agissent en se fixant aux domaines BIR des protéines IAP et empêchent ainsi l'inhibition des différentes caspases (Straszewski-Chavez *et al.*, 2005).

### 3. La régulation du transport de nutriments

La croissance fœtale est étroitement corrélée à **la quantité et à l'efficacité des différents systèmes de transport** présents à la surface du syncytiotrophoblaste (Évain-Brion, 2012). Ainsi, le transport du glucose, des acides gras et des acides aminés peut être modifié voire altéré par différentes situations et conduire à des anomalies de croissance fœtale tel que le retard de croissance *in utero* (Gaccioli and Lager, 2016). Il semblerait que l'ensemble des signaux en provenance du compartiment maternel soient perçus et intégrés par le placenta qui met en place une régulation de l'expression des différents transporteurs de nutriments. Cette régulation repose sur l'activation ou l'inhibition de la **voie mTOR** (mammalian target of rapamycin) qui agit ici comme un senseur (Roos *et al.*, 2009; Jansson *et al.*, 2012; Brett *et al.*, 2014) (**Figure 29**). La protéine mTOR contrôle notamment la traduction *via* la régulation de l'activité des **protéines ribosomales** 4E-BP1 (4E-bingding protein 1) et S6K1 (S6 kinase 1) (Jansson *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2015). L'ensemble des systèmes de transport présents dans le placenta a été décrit dans la **partie I** du **CHAPITRE 1**.



Figure 29. La voie mTOR est un senseur métabolique dans le placenta humain.

Suites à différents stimuli, la voie mTOR est activée ou inhibée. Celle-ci contrôle la phosphorylation d'enzymes ribosomales impliquées dans la traduction protéique. Elle agit alors comme un senseur métabolique en régulant la quantité de transporteurs de nutriments (GLUT et SNAT notamment) localisés dans la membrane plasmique.

• 99 •

### Effets de la sous-nutrition maternelle

Il est clairement établi qu'une restriction alimentaire chez la mère induit une diminution du poids de naissance du nouveau-né. Cela a notamment été observé durant la période de **famine** qu'ont connu les Pays-Bas à la fin de la Seconde Guerre Mondiale (1944-1945). Les femmes enceintes ont en effet donné naissance à des nourrissons avec un **poids inférieur à la normale** (Ross and Beall, 2008). Cette diminution du poids de naissance a été associée à des **anomalies de la physiologie placentaire** (taille, réseau vasculaire, fonction endocrine et transport de nutriments) chez les femmes dénutries (Gaccioli and Lager, 2016). Les mécanismes réellement impliqués dans ce phénomène de sous-nutrition sont difficiles à étudier chez l'espèce humaine. Cependant, un modèle de babouin soumis à une période de sous-nutrition au cours de la grossesse a démontré que cette condition nutritionnelle entraîne une diminution du poids et de la taille du placenta. De plus, ces effets sont associés à une réduction de l'expression de différents **transporteurs de glucose** (notamment GLUT1) et d'**acides aminés** (SNAT2, LAT1 et LAT2) (Kavitha *et al.*, 2014).

### \* Effets du diabète

Dans le cas de grossesses compliquées par un diabète, l'altération du transport de nutriments diffère selon l'origine du diabète (diabète de type 1 ou diabète gestationnel). Chez les femmes enceintes souffrant d'un diabète de type 1, une stimulation du **transport de glucose** associé à une augmentation de l'expression du **transporteur GLUT1** ont été observées dans le placenta à terme. Les données concernant le transport des acides aminés sont contradictoires. En revanche, les **transporteurs de lipides** (LPL, FABP1 et FABP4) sont également augmentés dans le placenta de ces femmes (Brett *et al.*, 2014).

En cas de diabète gestationnel, l'expression placentaire du transporteur GLUT1 et de la LPL ne semble pas être altérée. Cependant, une augmentation des **transporteurs des acides aminés** (dépendant ou non du sodium) et de la **protéine FABP4** est observée dans le placenta de ces femmes diabétiques (Brett *et al.*, 2014).

### Effets de l'âge maternel

La grossesse chez l'adolescente est associée à un certain nombre de complications et notamment à une réduction du poids du fœtus à la naissance (Weng *et al.*, 2014). Cet effet semble être corrélé à une réduction de l'expression des **protéines SNAT1 et SNAT2** dans le placenta provenant d'adolescentes compartivement à ceux de femmes majeures (Hayward *et al.*, 2012).

#### **Effets d'une grossesse pathologique : cas de la pré-éclampsie**

Dans le cas de la pré-éclampsie, le **transport des acides aminés** est dérégulé. Plus précisément, il a été observé une diminution du **transport de la taurine**, un dérivé d'acide aminé essentiel, chez les femmes pré-éclamptiques. En revanche, le **transport de l'arginine** est augmenté. De plus, l'expression des **transporteurs FATP1 et FATP4** est diminuée dans les placentas pré-éclamptiques (Gaccioli and Lager, 2016).

### Effets de l'altitude

Il a été observé que les femmes vivant en altitude présentent un risque plus élevé de donner naissance à des nourrissons présentant un petit poids pour l'âge gestationnel. Cet effet pourrait être corrélé à un défaut d'**apport en oxygène** au fœtus au cours de la grossesse (Gaccioli and Lager, 2016). Cependant, il semble que les populations vivant en altitude depuis plusieurs générations se sont adaptées à cet habitat. En effet, une étude menée à La Paz en Bolivie a démontré que les femmes vivant dans cette région montagneuse des Andes depuis peu de temps, donnent naissance à des nourrissons plus petits que les femmes présentes depuis plusieurs générations dans cette zone géographique. Chez ces dernières, une augmentation du **flux sanguin utéroplacentaire** permet d'augmenter l'apport en oxygène au fœtus (Vargas *et al.*, 2007). Parallèlement à ce rôle de l'oxygène, il a également été observé que l'altitude induit une réduction de l'expression du **transporteur de glucose GLUT1** dans le placenta humain (Gaccioli and Lager, 2016).

## \* Effets des infections

Les différentes infections bactériennes ou virales survenues au cours de la grossesse sont souvent associées à un retard de croissance intra-utérin. Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués sont

• 101 •

généralement peu connus. Dans le cas du **paludisme** (infection par le protozoaire *Plasmodium*), le flux sanguin à l'interface fœto-maternelle est dérégulé et l'efficacité du transport placentaire est réduite. Plus précisément, il a été observé une réduction de l'expression des **transporteurs du glucose et des acides aminés** au sein de la membrane microvillositaire du syncytiotrophoblaste issus de placentas infectés par Plasmodium (Gaccioli and Lager, 2016).

#### Effets du comportement maternel au cours de la grossesse

On estime que 10% des Européennes et des Américaines fument au cours de leur grossesse. Il a été notamment observé que le **tabagisme maternel** est associé à une réduction du poids du fœtus à la naissance. Plus précisément, la nicotine est responsable de la réduction du **transport des acides aminés** dans le placenta (Gaccioli and Lager, 2016). Les effets de l'alcool au cours de la grossesse sont également délétères. Ainsi, la diminution du poids du nourrisson est l'une des caractéristiques du **syndrome d'alcoolisation fœtale**. Il a été démontré *in vitro* que l'éthanol réduit le **transport des acides aminés essentiels** et des **acides gras** au sein du placenta (Gaccioli and Lager, 2016).

# F. Dérégulations du dialogue fœto-maternel et pathologies associées

Une grossesse saine se caractérise par un dialogue pertinent et efficace entre les différents types cellulaires constituant l'interface fœto-maternelle (cellules trophoblastiques, cellules déciduales, cellules immunitaires). Ainsi, une dérégulation des signaux moléculaires émis (hormones, facteurs de croissance, interleukines, enzymes...) peut être à l'origine de complications maternelles et/ou fœtales associées à une **grossesse pathologique** voire à une **hypofertilité** et même à une **infertilité totale**.

## 1. L'endométriose

#### Définition

L'endométriose est une pathologie gynécologique assez fréquente affectant 5 à 10% des femmes. Elle peut être asymptomatique. Cependant, l'endométriose est retrouvée chez 40% des femmes souffrant de **douleurs chroniques pelviennes** lors de la période des règles (Bulletti *et al.*, 2010; Vercellini *et al.*, 2013). L'endométriose se caractérise par la présence de tissu endométrial en dehors de la cavité utérine.

• 102 •

Cette localisation ectopique touche de nombreux organes, les plus fréquemment atteints étant les **ovaires**, le **rectum**, la **vessie** et le **vagin**. La présence de cellules endométriales apparaissant à distance de l'utérus (**œil**, **cerveau**, **poumon**) est également observée, bien que ce phénomène soit plus rare. Ces cellules extra-utérines possèdent les mêmes caractéristiques que les cellules « saines ». Elles présentent donc une activité cyclique dépendante de la sécrétion des hormones ovariennes (œstrogènes et progestérone). Dans 30 à 40% des cas, la maladie peut être à l'origine d'une **infertilité** (Bulletti *et al.*, 2010; Vercellini *et al.*, 2013).

#### \* Causes de l'endométriose

A ce jour, les mécanismes responsables de cette localisation endométriale ectopique sont peu connus. L'hypothèse principale suggère que l'endométriose serait le résultat de **menstruations rétrogrades**. Lors de ce phénomène, le sang menstruel transite par les trompes de Fallope jusqu'à la cavité abdominale. Ce sang transporte des cellules endométriales qui sont alors capables de générer de nouveaux « foyers endométriaux » hors de l'utérus. Des **facteurs individuels** peuvent influencer positivement la survenue de ce processus. Plus particulièrement, une puberté précoce, des cycles menstruels longs, des flux menstruels abondants, une sédentarité augmentée ou encore une consommation de tabac sont des facteurs aggravants (Vercellini *et al.*, 2013).

### \* Pathogenèse

Il est estimé que 30 à 50% des femmes développant une endométriose sont infertiles. Ainsi, la fécondité qui se caractérise par la probabilité d'être enceinte à chaque mois du cycle menstruel est comprise entre 0,15 et 0,20 chez la femme saine. Chez la femme endométriosique, ce taux est fortement diminué (0,02 à 0,10). Cette baisse de la fertilité est notamment associée à des **désordres ovariens** et des **altérations des fonctions endométriales** (Bulletti *et al.*, 2010).

La survenue de l'endométriose est corrélée au développement de **follicules anormaux** au sein de l'ovaire. Plus précisément, de nombreux follicules non-rompus ont été observés. Ceux-ci correspondent à l'absence de libération de l'ovocyte au cours de l'ovulation. Ce phénomène pourrait s'expliquer par des dérégulations hormonales, telles que la présence de pics répétitifs et prématurés de LH. L'endométriose se définit également par une durée de la **phase folliculaire prolongée** et des **anomalies** 

• 103 •

**de la phase lutéale** associées à de faibles taux d'œstrogènes et de progestérone sécrétés (Nulsen *et al.*, 2012).

Des anomalies de la **récéptivité utérine** ont également été observées dans le contexte de l'endométriose. Une diminution de l'expression de l'intégrine  $\alpha\nu\beta3$  et de la L-sélectine a été mise en évidence dans les cellules endométriosiques humaines. L'endométriose conduirait ainsi à un défaut des phases d'apposition et d'adhésion de l'embryon à l'utérus (Nulsen *et al.*, 2012). L'endométriose se caractérise également par des anomalies de la décidualisation. Il a notamment été observé *in vitro*, que l'expression d'IGFBP-1 et de prolactine est diminuée au cours de la **différenciation des cellules déciduales** issues de femmes endométriosiques (Klemmt *et al.*, 2006). Cet effet pourrait être directement dû à la diminution des taux circulants de progestérone et d'œstrogènes chez ces femmes (Vercellini *et al.*, 2013). De plus, les **capacités prolifératives** des cellules endométriales issues de femmes souffrant d'endométriose sont fortement augmentées, tout comme l'**activité des métalloprotéases** MMP-2 et MMP-9 (Klemmt *et al.*, 2006; Weigel *et al.*, 2012). Ces données confirment le fort potentiel invasif de ces cellules ectopiques.

Enfin, l'endométriose se définit par une **inflammation accrue de l'endomètre**. En effet, le nombre de macrophages recrutés est plus important dans le contexte de l'endométriose. De plus, la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, MCP-1) est augmentée. Ces effets semblent faire intervenir la voie NF- $\kappa$ B (Vercellini *et al.*, 2013). Outre la décidualisation et la réceptivité utérine déficientes, il semble donc que l'endométriose perturbe également la mise en place de la réponse tolérogène à l'embryon dans le compartiment maternel.

## 2. Les échecs répétés d'implantation

#### ✤ <u>Définition</u>

La pathologie des échecs répétés d'implantation est diagnostiquée chez la femme lorsque celle-ci présente des échecs d'implantation inexpliqués au cours de sa prise en charge en assistance médicale à la procréation. Ces échecs se caractérisent par une absence de grossesse, malgré le transfert significatif d'embryons de bonne qualité (Dos Santos *et al.*, 2012). Cependant, il n'existe pas de définition

• 104 •

universelle, chaque centre hospitalier semblant avoir ses propres critères. Ainsi, lors d'une procédure de fécondation *in vitro*, le clinicien établit un seuil selon lequel il est anormal qu'aucun des embryons transférés dans l'utérus de la patiente ne se soit implanté (Coughlan *et al.*, 2014). Cependant, une étude a démontré que la majorité des praticiens considère qu'une patiente souffre d'échecs répétés d'implantation lorsqu'aucune implantation n'a été diagnostiquée après le transfert d'au moins **trois embryons de bonne qualité** (Timeva *et al.*, 2014).

# **Causes des échecs répétés d'implantation**

Les échecs répétés d'implantation sont généralement causés par des facteurs **utérins** ou **embryonnaires** (Simon and Laufer, 2012). D'autres causes diverses sont également répertoriées et citées dans le **Tableau 8**. Cependant, dans de nombreux cas, ces échecs restent **idiopathiques**. Ainsi, la prise en charge de ces femmes en assistance médicale à la procréation reste très difficile (Timeva *et al.*, 2014).

UTERUS	<ul> <li>Malformations congénitales         <ul> <li>Défaut du développement ou de fusion des canaux de Müller</li> <li>Utérus cloisonné</li> <li>Utérus bicorne</li> </ul> </li> <li>Pathologies utérines intra-cavitaires         <ul> <li>Fibrome sous-muqueux ; Fibrome interstitiel</li> <li>Polypes endométriaux</li> <li>Synéchies utérines</li> <li>Adénomyose utérine</li> </ul> </li> </ul>	
EMBRYON	<ul> <li>Facteurs maternels         <ul> <li>Dérégulations hormonales (sécrétion de FSH, LH ou prolactine altérées)</li> <li>Mauvaise réponse à la stimulation ovarienne (peu d'ovocytes ponctionnés)</li> <li>Ovocytes immatures ; Anomalies chromosomiques ; ADN endommagé</li> </ul> </li> <li>Facteurs paternels         <ul> <li>Dommage de l'ADN spermatique (fragmentation)</li> <li>Asthénospermie</li> <li>Oligospermie</li> </ul> </li> <li>Facteurs embryonnaires         <ul> <li>Développement embryonnaire altéré ; Embryons aneuploïdes</li> </ul> </li> </ul>	
AUTRES	<ul> <li>Causes diverses</li> <li>Désordres métaboliques (diabète) ou hormonaux (maladies thyroïdiennes)</li> <li>Thrombophilie ; Syndrome des anti-phospholipides</li> <li>Infections</li> <li>Style de vie ; Facteurs psychologiques</li> <li>Désordres immunologiques</li> </ul>	

Tableau 8. Les principales causes des échecs répétés d'implantation.

## Pathogenèse

De nombreuses analyses protéomiques et génomiques comparant les endomètres de femmes fertiles et ceux issus de femmes souffrant d'échecs répétés d'implantation ont été réalisées.

Parmi les études les plus récentes, il a été observé que la sécrétion de l'**apolipoprotéine** A-I est beaucoup plus importante chez les patientes infertiles. Cette protéine est identifiée comme une **protéine** « **anti-implantation** » et pourrait être utilisée comme un biomarqueur de la survenue des échecs répétés d'implantation (Brosens *et al.*, 2010).

Une équipe a également analysé *in silico* l'expression de 19 285 gènes exprimés dans l'endomètre. Les résultats ont conclu que **179 gènes sont impliqués dans la réceptivité utérine**. Cette étude a également démontré que l'expression de 13 gènes est dérégulée chez les femmes souffrant d'échecs répétés d'implantation comparativement aux femmes fertiles. Notamment, l'expression de molécules d'adhésion telles que le récepteur CD55 ou encore la mucine-16 est perturbée (Bhagwat *et al.*, 2013).

Cette étude a également mis en évidence une diminution de l'expression du facteur **IGFBP-1**, suggérant que la **décidualisation** est déficiente chez ces femmes infertiles (Bhagwat *et al.*, 2013). D'autres travaux récents ont confirmé cette hypothèse. En effet, dans le cas d'échecs répétés d'implantation, la chaîne de biosynthèse des **prostaglandines** est perturbée. Dans les cellules déciduales, les prostaglandines stimulent également la décidualisation par la voie de l'AMP cyclique et sont donc très importantes au cours de la maturation endométriale (Vinketova *et al.*, 2016). Plus précisément, l'expression des gènes codant les enzymes COX-2 (cyclo-oxygenase-2) et sPLA2 (secretory phospholipase A2) est diminuée dans les endomètres pathologiques (Timeva *et al.*, 2014). Ainsi, la dérégulation de cette voie de biosynthèse conduit à une altération de la **réceptivité utérine** et de la **maturation endométriale** (Achache *et al.*, 2010; Timeva *et al.*, 2014).

Cependant, malgré ces études, la compréhension des mécanismes physiopathologiques à l'origine des échecs répétés d'implantation restent encore à ce jour, extrêmement parcellaires.
## 3. Les fausses-couches spontanées à répétition

#### \* <u>Définition</u>

La fausse-couche ou avortement spontané est la complication la plus fréquente de la gestation. Elle affecte 12 à 24% des grossesses, soit 200 000 femmes chaque année en France (Séjourné *et al.*, 2009). Selon la définition de l'Organisation Mondiale de la Santé, une fausse-couche correspond à l'expulsion d'un fœtus avant la 20<sup>ème</sup> semaine de grossesse ou qui présente un poids inférieur à 500 grammes. Lorsqu'une femme subit au moins **trois fausses-couches successives** avec le même conjoint, on parle de fausses-couches spontanées à répétition. Cette pathologie concerne approximativement 1% des femmes dans le monde (Ford and Schust, 2009).

#### \* Causes des fausses-couches spontanées à répétition

Il est bien établi que le risque de fausses-couches augmente avec l'âge maternel (de la Rochebrochard and Thonneau, 2002). Cependant, il est estimé que dans près d'un cas sur deux, les causes de ces faussescouches répétées ne sont pas identifiées. En revanche, des causes **immunologiques**, **endocrines**, **anatomiques**, **génétiques** et **infectieuses** sont bien décrites (Ford and Schust, 2009) (**Figure 30**).

- Les **causes immunologiques** sont liées à un défaut de la réponse immunotolérante de la mère vis-àvis de l'embryon. De la même manière, les maladies auto-immunes telles que le lupus, la maladie de Crohn et le syndrome des anti-phospholipides constituent des facteurs de risque supplémentaires de fausses-couches à répétition (Ford and Schust, 2009; Lejeune, 2010).

- Les causes **endocrines** des fausses-couches sont notamment définies par des anomalies de la phase lutéale du cycle menstruel, un diabète gestationnel, des maladies thyroïdiennes ou encore une hyperprolactinémie. Le développement d'un syndrome des ovaires polykystiques est également évoqué dans certains cas (Ford and Schust, 2009).

Les causes anatomiques sont des anomalies morphologiques de l'utérus (adhésions intra-utérines, fibromes, polypes, utérus bicorne, utérus cloisonné) affectant la vascularisation de l'endomètre et donc la placentation (Ford and Schust, 2009).

- Les causes **génétiques** correspondent à des anomalies de structure des chromosomes embryonnaires issus de réarrangements défectueux des chromosomes parentaux (translocations induisant des mécanismes d'insertion ou de délétion) (Ford and Schust, 2009; Lejeune, 2010).

Les causes infectieuses sont décrites mais peu documentées dans le cadre des fausses-couches à répétition. Ainsi, la listériose, la toxoplasmose, la rubéole, l'herpès ou encore la varicelle sont suspectées d'induire des avortements spontanés (Ford and Schust, 2009).





Modifié d'après Ford *et al.* 2009. Dans la majorité des cas, la cause des fausses-couches spontanées à répétition ne peut être identifiée. Lorsqu'elle l'est, les causes immunologiques (20%) sont les plus fréquentes. Les raisons génétiques et infectieuses restent quant à elle assez rares (moins de 5% des cas).

## \* Pathogenèse

Les femmes souffrant de fausses-couches spontanées à répétition présentent une **réaction inflammatoire accrue** de l'endomètre. Plus précisément, il est décrit que suite à une infection ou un traumatisme, l'expression de l'interleukine IL-33 est stimulée, induisant une réponse pro-inflammatoire exacerbée dans l'endomètre. La **décidualisation** est également déficiente et les cellules sont plus vulnérables au **stress oxydatif**. De plus, les cellules endométriales présentent une **sénescence** prématurée (Lucas *et al.*, 2016). Une **invasion trophoblastique** endovasculaire déficiente, pourrait également être la cause de ces fausses-couches (Sebire *et al.*, 2002; Ball *et al.*, 2006). Enfin, il est décrit que les cellules déciduales issues de femmes souffrant d'avortements spontanés à répétition échouent à discriminer un embryon de bonne qualité d'un **embryon de mauvaise qualité** (Weimar *et al.*, 2012; Gellersen and Brosens, 2014). En effet, l'endomètre agirait comme un senseur de la qualité embryonnaire. Dans le cas de fausses-couches à répétition, il semblerait que les cellules endométriales développent une réponse inadaptée à certains signaux émis par les embryons non-viables (production anormale d'ATP, d'espèces réactives de l'oxygène ou d'hCG) (Weimar *et al.*, 2012).

## 4. Le placenta accreta

#### Définition

Le placenta accreta correspond à une forme d'invasion trophoblastique excessive au cours de laquelle le placenta envahit l'utérus profondément, se liant ainsi anormalement au myomètre. On distingue trois grades différents dans cette pathologie. Le **placenta accreta** correspond à l'adhésion anormale du trophoblaste au myomètre (81% des cas). On parle de **placenta increta** (12%) lorsque le trophoblaste envahit le myomètre et de **placenta percreta** (7%) lorsqu'il traverse le myomètre et atteint d'autres organes, tels que la vessie par exemple (Belfort *et al.*, 2010) (**Figure 31**).



Figure 31. Différents stades d'invasion trophoblastiques et pathologies associées.

Ainsi, le placenta accreta est associé à de forts **risques hémorragiques** au cours de la délivrance et lors de la période post-partum. Dans certains cas, il peut conduire à la réalisation d'une hystérectomie en urgence. Le taux de mortalité maternelle est élevé. Il est estimé à 7% dans la population mondiale (Garmi and Salim, 2012).

#### ✤ <u>Causes du placenta accreta</u>

L'augmentation de la prévalence du placenta accreta au cours du temps semble être associée à l'élévation du nombre d'accouchement réalisés par **césarienne**. Le risque de développer cette pathologie est également corrélé à la présence de fibromes, à la réalisation d'un curetage endométrial, à la formation d'adhérences dans l'utérus (syndrome d'Asherman), à un âge maternel avancé, à la multiparité, à l'hypertension chronique et au tabagisme (Garmi and Salim, 2012).

## \* Pathogenèse

Les mécanismes moléculaires à l'origine du placenta accreta ne sont pas connus. Cependant, l'hypothèse généralement évoquée semble être une **décidualisation déficiente**, une **invasion excessive** ou la combinaison de ces deux phénomènes (Garmi and Salim, 2012). Ainsi, il a été observé que la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques et pro-invasifs par les cellules trophoblastiques est augmentée dans le placenta accreta (Tseng and Chou, 2006). En parallèle, une décidue altérée perd ses capacités à freiner l'invasion trophoblastique (Garmi *et al.*, 2011; Garmi and Salim, 2012).

## 5. La pré-éclampsie

#### \* <u>Définition</u>

La pré-éclampsie est une complication de la grossesse qui affecte principalement la mère. Elle se définit généralement par une **hypertension** *de novo*, associée à une **protéinurie** (supérieure à 300 mg/jour) apparues après la 20<sup>ème</sup> semaine de grossesse. Son incidence varie d'un pays à l'autre. Cependant, on estime que 3 à 5% des femmes enceintes sont concernées. En fonction de la sévérité de la maladie, la pré-éclampsie se caractérise également par une insuffisance rénale, une atteinte hépatique et des complications neurologiques. Des dysfonctions utéroplacentaires sont également observées. Elles peuvent être à l'origine d'un retard de croissance intra-utérin, d'une souffrance fœtale et d'un accouchement prématuré. Lorsqu'elle n'est pas traitée à temps, la pré-éclampsie évolue vers l'**éclampsie** caractérisée par une série de contractions musculaires, une apnée et des convulsions. Les crises cardiaques, la rupture du foie, les œdèmes pulmonaires et l'insuffisance rénale sont également caractéristiques de cet état (Mol *et al.*, 2016). Elle est ainsi l'une des causes principales de mortalité

dans les pays en développement où elle concerne plus de 23% des morts maternelles. Dans les pays développés, où la surveillance et la prise en charge des patientes sont mieux organisées, ce chiffre atteint encore 13% (Zakiyah *et al.*, 2015).

# \* <u>Causes de la pré-éclampsie</u>

Les causes exactes de la pré-éclampsie ne sont pas véritablement décrites. Il existe cependant différents facteurs de risque qui favorisent le développement de cette pathologie (Mol *et al.*, 2016) (**Tableau 9**).

Tableau 9. Facteurs favorisant le développement de la pré-éclampsie.

<b>RISQUE ELEVE</b>	<b>RISQUE MODERE</b>	<b>RISQUE FAIBLE</b>
Hypertension Maladies rénales chroniques Diabète (type 1 et type 2) Maladies auto-immunes	Première grossesse > 10 ans entre deux grossesses Age avancé (> 40 ans) Obésité Antécédents familiaux Grossesse multiple Greffe du rein Ovaires polykystiques	Maladies cardiaques Poids de la mère à la naissance Saignements vaginaux Fausse-couche antérieure Délai de conception (> 1 an) Pression artérielle élevée

# Pathogenèse

Le défaut d'invasion trophoblastique et de remodelage des artères spiralées utérines est un **évènement précoce** qui a lieu entre les 8<sup>ème</sup> et 16<sup>ème</sup> semaines d'aménorrhée, au cours de la phase invasive (Uzan *et al.*, 2011). Cependant, les premiers signes cliniques n'apparaissent pas avant la 22<sup>ème</sup> semaine d'aménorrhée, rendant le **diagnostic très tardif** (Evain-Brion and Malassiné, 2011).

La pré-éclampsie est associée à un défaut du processus invasif caractérisé notamment par l'**absence de bouchons trophoblastiques** dans la lumière des artères utérines (**Figure 32**). Ainsi, le placenta précoce se développe dans un environnement anormalement riche en oxygène. L'altération de ce mécanisme peut expliquer les anomalies de structure du placenta, identifiées dans le cadre de la pré-éclampsie (Roberts and Escudero, 2012; Chen *et al.*, 2013). En effet, les placentas issus de grossesses prééclamptiques sont de petite taille et présentent un défaut de vascularisation (Roberts and Escudero, 2012). Dans les conditions physiologiques, la prolifération cellulaire et l'angiogenèse placentaires sont régulés par l'hypoxie, caractéristique du premier trimestre (Evain-Brion and Malassiné, 2011). A partir du deuxième trimestre, l'afflux sanguin vers la chambre intervilleuse devient insuffisant. Le défaut d'invasion trophoblastique conduit au non-remplacement des cellules musculaires de la paroi des artères utérines. Ces cellules musculaires gardent alors leur capacité de réponse à divers agents vasoconstricteurs tels que l'endothéline-1 (Evain-Brion and Malassiné, 2011). Parallèlement, les cellules déciduales sécrètent de plus faibles quantités de substances vasodilatatrices, notamment d'oxyde nitrique. Cette inhibition du stress nitrosatif est associée à une vasoconstriction responsable d'une ischémie placentaire chronique et d'un stress oxydatif accru. L'ischémie de l'unité fœtomaternelle est l'une des causes principales du retard de croissance intra-utérin voire de la mort fœtale in utero associés à la pré-éclampsie (Uzan et al., 2011). Le stress oxydatif induit quant à lui, la production de différentes molécules (radicaux libres, lipides oxydés, cytokines...) qui participent au dysfonctionnement du syncytiotrophoblaste. En effet, ces signaux stimulent notamment l'apoptose trophoblastique et entraînent la libération accrue de corps apoptotiques dans la circulation maternelle (Evain-Brion and Malassiné, 2011). Ces corps apoptotiques sont responsables de l'état d'inflammation généralisé de l'endothélium maternel qui entraîne une hyperperméabilité des vaisseaux sanguins, une thrombophilie et une hypertension. Cette dysfonction endothéliale systémique est à l'origine de toutes les complications cliniques (hépatiques, cérébrales ou rénales) observées dans le contexte de la prééclampsie (Uzan et al., 2011).

Différentes études ont mis en évidence une diminution de la production du **facteur pro-angiogénique PIGF** (placental growth factor) et une augmentation de la concentration du **facteur anti-angiogénique sFIt-1** (soluble fms-like tyrosine kinase-1) dans les sérums de femmes au cours de grossesses prééclamptiques (Mol *et al.*, 2016). La régulation de la balance angiogénique PIGF/sFlt-1 pourrait donc constituer un biomarqueur potentiel de la pré-éclampsie.



Figure 32. Défaut d'invasion trophoblastique dans le contexte de la pré-éclampsie.

D'après Pennington *et al.* 2012. Comparativement à la situation physiologique (A), dans le cas de la pré-éclampsie (B) l'invasion interstitielle réalisée par les cellules trophoblastiques extravilleuses (ECTB cells) est limitée. L'invasion endovasculaire est quasiment absente, empêchant le remodelage des artères spiralées utérines. Cellesci répondent alors davantage aux signaux vasoconstricteurs, limitant l'influx sanguin vers la chambre intervilleuse. L'ensemble de ces mécanismes créent une hypoxie et stimule le stress oxydatif qui sont tous deux à l'origine des signes cliniques de la pré-éclampsie. FV : villosité flottante ; AV : villosité crampon.

# 6. Le retard de croissance intra-utérin

## Définition

Le retard de croissance *in utero* (RCIU) est une complication de la grossesse affectant 10% des fœtus (Haroun, 2017). Il s'agit d'une anomalie dynamique de la croissance se traduisant par un fœtus d'une taille insuffisante pour son âge gestationnel. Tout au long de la grossesse, la mesure de différents **paramètres biométriques** (le diamètre bipariétal correspondant à la largeur du crâne, le périmètre crânien, le périmètre abdominal et la longueur du fémur) permet de comparer ces valeurs à des courbes de référence exprimées en percentile. Ainsi, un **infléchissement** de la courbe de croissance voire un **arrêt total de la croissance** sont caractéristiques du RCIU. Classiquement, cette pathologie est définie pour un fœtus qui présente un poids de naissance inférieur au **10<sup>ème</sup> percentile** (Ego, 2013; Sharma *et al.*, 2016).

Le RCIU est à l'origine de **nombreuses complications** observées au cours de la **période néonatale**. Plus précisément les nourrissons présentant un petit poids de naissance souffrent fréquemment d'hypertension, de dérégulations de la glycémie, d'immunodéficience, de difficultés de nutrition ou encore d'anomalies neurocomportementales. Les risques de morts fœtales *in utero* et de morts néonatales sont également plus élevés. Le RCIU engendre aussi de nombreuses **complications à long terme**. Il s'agit dans un premier temps de déficiences neurologiques observées au cours de la scolarité de l'enfant (autisme, déficit d'attention, troubles moteurs, retard mental...). Enfin, le RCIU est accompagné d'une prédisposition à certaines pathologies à l'âge adulte (diabète, obésité, syndrome métabolique, cancers, maladies neurodégénératives, maladies rénales et hépatiques, dépression, anxiété, schizophrénie...) (Sharma *et al.*, 2016).

# \* Causes du retard de croissance intra-utérin

Le RCIU résulte de causes maternelles, placentaires ou fœtales. Il peut également être dû à une combinaison de tous ces facteurs (Sharma *et al.*, 2016) (**Tableau 10**).

CAUSES MATERNELLES	CAUSES PLACENTAIRES	CAUSES FŒTALES
Age (< 16 ans ou > 35 ans) Altitude ; Hypoxie Ethnie ; Travail physique Statut socio-économique Tabac ; Drogue ; Alcool Agents pharmacologiques Poids (IMC < 20) < 6 mois entre deux grossesses Antécédents de RCIU Fécondation <i>in vitro</i> Sous-nutrition Maladies infectieuses Désordres immunologiques Grossesse pathologique Hypertension ; Diabète	Poids (< 350 grammes) Vascularisation anormale Dysfonctions (échanges) Artérites Grossesse molaire Lésions inflammatoires Artère ombilicale unique Infections Hématomes	Anomalies chromosomiques Maladies génétiques Malformations congénitales Grossesse multiple Infections congénitales Désordres métaboliques

Tableau 10. Facteurs favorisant le développement du retard de croissance in utero.

# Pathogenèse

La survenue du RCIU est un phénomène étroitement lié à la perturbation de la fonction d'échanges du placenta. Des altérations d'origine génétique, endocrine, infectieuse, environnementale ou

comportementale peuvent conduire à une diminution de l'efficacité du transport transplacentaire des nutriments, comme décrit dans la partie D de ce chapitre (Evain-Brion and Malassiné, 2011). La diminution des échanges nutritionnels entre la mère et le fœtus est généralement due à une réduction du transport de nutriments. En effet, l'expression des différents transporteurs de nutriments (glucose, acides aminés, acides gras) est altérée dans le syncytiotrophoblaste. (Straszewski-Chavez *et al.*, 2005; Sharp *et al.*, 2010; Gaccioli and Lager, 2016). Les placentas issus de fœtus présentant un RCIU sont également de petite taille et présentent des défauts de vascularisation et de débit sanguin. Ces anomalies de la structure placentaire sont associées à une apoptose excessive et à un défaut de l'invasion trophoblastique (Kaufmann *et al.*, 2003; Sharp *et al.*, 2010).

## 7. Le diabète gestationnel et la macrosomie

#### ✤ <u>Définition</u>

Le diabète gestationnel concerne 5% des grossesses. Il constitue un facteur de risque pour la santé de la mère et du fœtus. L'Organisation Mondiale de la Santé qualifie le diabète gestationnel par une **hyperglycémie de sévérité variable**, diagnostiquée au cours de la grossesse. Les femmes présentant un diabète gestationnel sont plus susceptibles de développer une maladie hypertensive au cours de la grossesse, les prédisposant à la pré-éclampsie notamment. Les accouchements par césarienne sont également plus fréquents dans le contexte du diabète gestationnel. Pour le fœtus, le **risque de macrosomie** est augmenté, rendant l'accouchement plus difficile et dangereux. De plus, la macrosomie (poids de naissance supérieur à 4000 grammes) prédispose le nourrisson à l'obésité, au diabète de type 2 et au syndrome métabolique au cours de sa vie (Kampmann *et al.*, 2015).

## \* Causes du diabète gestationnel

Plusieurs facteurs semblent être impliqués dans le développement du diabète gestationnel. Plus précisément, un indice de masse corporel élevé en début de grossesse prédispose la femme à cette pathologie. De la même manière, l'obésité et plus généralement l'excès de tissu adipeux augmentent le risque de développer ce diabète. En effet, de nombreux facteurs synthétisés par les adipocytes possédent une action insulino-résistante. Enfin, l'ethnie (notamment l'origine asiatique), l'âge maternel (supérieur

à 35 ans), les antécédents familiaux de diabète de type 2 ou de diabète gestationnel, la multiparité ou encore la présence d'un syndrome des ovaires polykystiques constituent des facteurs de risque nonnégligeables de développer un diabète gestationnel (Kampmann *et al.*, 2015).

# Pathogenèse

Au cours de la grossesse saine, les hormones et cytokines placentaires (notamment le TNF- $\alpha$ ) exercent une action insulino-résistante, diminuant la sensibilité de la mère à l'insuline. Le stockage du glucose dans les différents tissus (muscle, foie, tissu adipeux) est ainsi diminué. La mère doit alors augmenter de près de 250% sa production d'insuline afin de réguler sa glycémie. Le diabète gestationnel survient lorsque la patiente n'est pas capable de produire des taux d'insuline suffisants pour répondre à cette **insulino-résistance gravidique**. Le diabète gestationnel se traduit par une **hyperglycémie maternelle**, qui stimule le transfert du glucose de la mère vers le fœtus. En réponse à ce signal hyperglycémique, le fœtus augmente sa propre production d'insuline. L'augmentation du transport de glucose et de la sécrétion d'insuline exerce un effet positif sur la croissance du fœtus. Ainsi, le diabète gestationnel contribue à la mise en place d'une **macrosomie fœtale** (Kampmann *et al.*, 2015) (**Figure 33**).





Au cours de la grossesse, le placenta sécrète de nombreux facteurs (hormones et cytokines) qui exercent une action insulino-résistante physiologique chez la mère (1). Ce phénomène entraîne une augmentation des taux de glucose sanguins maternels. Le diabète gestationnel apparaît lorsque la mère ne parvient pas à réguler cette hyperglycémie (2). L'hyperglycémie maternelle augmente alors le transport transplacentaire du glucose, vers le fœtus qui réagit en augmentant sa sécrétion d'insuline (3). L'hyperglycémie associée à l'hyperinsulinémie fœtales sont responsables de la stimulation de la croissance fœtale et de la macrosomie (4).

# CHAPITRE 3 | L'ADIPONECTINE

# A. Le tissu adipeux : un organe biologiquement actif

Longtemps considéré comme un tissu inerte dont la fonction principale consistait à stocker les graisses, le tissu adipeux a progressivement acquis le statut de véritable organe endocrine. En effet, au cours de ces dernières décennies, de nombreux facteurs sécrétés par les adipocytes ont été mis en évidence (Ailhaud, 1998). A ce jour, plusieurs centaines de facteurs adipocytaires ont été identifiés (Lehr *et al.*, 2012). Ces facteurs exercent des actions **auto/paracrines** et **endocrines** sur des organes tels que le cerveau, le foie et les muscles. Aujourd'hui, le tissu adipeux est considéré comme un organe multifonctionnel (Ailhaud, 1998; Hauner, 2005).

Les facteurs adipocytaires, *via* leur action autocrine ou paracrine contrôlent localement le **métabolisme lipidique**. C'est notamment le cas de la lipoprotéine lipase et de l'apolipoprotéine E qui régulent la capture et le transport des lipides vers les adipocytes (Fried and DiGirolamo, 1986; Zechner *et al.*, 1991). D'autres familles de molécules telles que les eicosanoïdes régulent la **différenciation adipocytaire** (également appelée adipogenèse). Par exemple, la prostacycline exerce un effet pro-différenciant et la prostaglandine E2 présente un effet anti-différenciant (Négrel, 1999; Inazumi *et al.*, 2011). Certains facteurs de croissance produits par les adipocytes sont également impliqués dans le contrôle de l'adipogenèse, tel que le VEGF, l'IGF-1 et le TGF- $\beta$  (Choy and Derynck, 2003; Kloting *et al.*, 2008; Berendsen and Olsen, 2014).

Les adipocytes sécrètent par ailleurs de nombreux facteurs exerçant une **action endocrine**. Ainsi, le tissu adipeux constitue une source importante d'œstrogènes, notamment d'œstrone provenant de la conversion de l'androstènedione d'origine surrénalienne par la cytochrome P450 aromatase adipocytaire (Ailhaud, 1998). Différents facteurs adipocytaires tels que l'angiotensinogène et le PAI-1 régulent la pression artérielle (Cassis *et al.*, 1988; Shimomura *et al.*, 1996). Enfin, de nombreuses molécules

exerçant des effets pléiotropes dans l'organisme, sont également synthétisées en grandes quantités par le tissu adipeux. Ces molécules sont regroupées sous le nom d'**adipokines**.

Une dérégulation du dialogue moléculaire entre les adipocytes et leurs cellules cibles est à l'origine de troubles métaboliques tels que l'insulino-résistance, les dyslipidémies ou l'hypertension (Junquero and Rival, 2005). L'ensemble de ces anomalies de l'homéostasie glucido-lipidique sont regroupées sous le terme de **syndrome métabolique** et prédisposent l'individu à des pathologies telles que le diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires et toutes les complications associées (infarctus, crise cardiaque...) (Deng and Scherer, 2010).

# B. Les adipokines

La famille des adipokines rassemble toutes les cytokines produites majoritairement par le tissu adipeux, bien que d'autres types cellulaires soient également capables de les synthétiser. En cas d'obésité, la sécrétion de ces facteurs est altérée, favorisant ainsi la survenue de diverses pathologies dont le syndrome métabolique. Parmi toutes les adipokines identifiées, seules les plus décrites seront détaillées.

# 1. La leptine

La leptine (du grec *leptos*, signifiant mince) fut la première adipokine découverte en 1994 (Zhang *et al.*, 1994). Aujourd'hui encore, il s'agit de l'adipokine la plus étudiée. Produit du gène *ob*, situé sur le chromosome 7 humain, la leptine est une hormone polypeptidique de 16 kDa (167 acides aminés) dont l'expression est induite au cours de la différenciation adipocytaire (Leroy *et al.*, 1996). Longtemps considérée comme une hormone spécifiquement sécrétée par le tissu adipeux, il a été démontré par la suite que la leptine est également produite par le placenta (Masuzaki *et al.*, 1997), l'estomac (Breidert *et al.*, 1999), le muscle squelettique (MacDougald *et al.*, 1995), la glande mammaire, le testicule, l'ovaire, l'endomètre, l'hypothalamus et l'hypophyse (Al-Suhaimi and Shehzad, 2013). Les concentrations de leptine circulante sont proportionnelles à l'indice de masse corporelle (IMC) et à la masse grasse, oscillant entre 5 et 10 ng/ml chez les individus normo-pondérés et entre 40 et 100 ng/ml au sein de la population obèse (Howard *et al.*, 2010).

La leptine exerce son action par l'intermédiaire du récepteur ob-R. Six isoformes de ce récepteur ont été décrites. Il s'agit des isoformes Ob-Ra, b, c, d, e et f. Elles sont toutes issues d'épissages alternatifs multiples de l'extrémité 3' de l'ARN messager (Lee *et al.*, 1996). L'isoforme ob-Re présente la particularité d'être un récepteur soluble. Les autres isoformes possèdent toutes un seul domaine transmembranaire et diffèrent entre elles uniquement au niveau de la partie C-terminale intracellulaire (Tartaglia *et al.*, 1995). La forme ob-Rb principalement exprimée dans l'hypothalamus, possède un domaine intracellulaire suffisamment long pour activer la voie JAK-STAT (janus kinase-signal transducer and activator of transcription). Suite à la liaison à Ob-Rb, la leptine est également capable d'induire les voies MAPK (mitogen activated protein kinase), PI3K (phosphoinositide-3 kinase), AMPK (AMP-activated kinase) et PKA (protein kinase A). Dans les tissus périphériques, l'isoforme ob-Ra est majoritaire. Son domaine intracellulaire très court permet à la leptine d'exercer ses effets *via* les voies MAPK (Uhbeck, 2006).

Les effets de la leptine ont été mis en évidence à l'aide d'un modèle de souris obèses exprimant une forme tronquée de la protéine (modèle *ob/ob*). Outre leur obésité, ces souris sont hyperphages (Zhang *et al.*, 1994). Cependant, l'injection de leptine recombinante chez ces animaux permet de réduire la prise alimentaire, démontrant le rôle essentiel de la leptine dans le **contrôle de la satiété** (Halaas *et al.*, 1995). Cette action s'opère dans l'hypothalamus, où la leptine inhibe la libération des neuropeptides orexigènes AgRP (agouti-related protein) et NPY (neuropeptide Y) et induit celle du neuropeptide anorexigène, la pro-opiomélanocortine (Allison and Myers, 2014). Parallèlement à ce trouble du comportement alimentaire, les souris *ob/ob* présentent de lourds désordres métaboliques (anomalies de l'homéostasie glucidique et dyslipidémies) associés à de faibles dépenses énergétiques, pouvant une fois encore être corrigés par l'administration de leptine, suggérant un effet de cette adipokine sur la **régulation de l'homéostasie glucido-lipidique**. Le maintien de cette homéostasie est assurée par une action directe sur les tissus périphériques (foie, muscle, pancréas, tissu adipeux) et par une action centrale, *via* le système nerveux autonome sympathique et parasympathique Plus précisément, la leptine induit une diminution de la sécrétion d'insuline et de glucagon par le **pancréas**. Elle contrôle également la production **hépatique** de glucose en inhibant la néoglucogenèse et agit sur le métabolisme glucido-

lipidique du **muscle squelettique** en augmentant le catabolisme. Enfin, dans le **tissu adipeux**, la leptine exerce une régulation autocrine de la thermogenèse, de la lipolyse et de la lipogenèse, assurant ainsi l'homéostasie de la masse grasse (**Figure 34**).





Figure 34. Principaux rôles de la leptine dans l'organisme humain.

Modifié d'après Denroche *et al.* 2012. La leptine favorise la consommation et la dégradation des lipides et des glucides. En parallèle, la leptine inhibe la formation de glucose et de lipides *de novo*. La leptine exerce cette action en agissant directement sur les organes clés et au niveau central *via* le système nerveux autonome.

La leptine est également capable d'exercer des effets pléiotropes, tels que la **prolifération**, la **différenciation** et la **mort cellulaires** (Dieudonne *et al.*, 2002; Machinal-Quélin *et al.*, 2002; Gullicksen *et al.*, 2003). La leptine est également décrite comme un **facteur vasoactif** (Lembo *et al.*, 2000), **immunomodulateur** (Naylor and Petri, 2016) et **angiogénique** (Park *et al.*, 2001).

Enfin, le modèle de souris ob/ob a également été fondamental pour la mise en évidence et la compréhension des liens entre le tissu adipeux et la **fonction de reproduction**. Les souris ob/ob sont obèses et stériles indépendamment du sexe. Cependant, l'injection de leptine permet de restaurer la fertilité (Chehab *et al.*, 1996). De plus, dans un autre modèle présentant un gène *ob-R* muté, une stérilité ne pouvant pas être corrigée est également observée. Bien que très rares chez l'espèce humaine, des mutations des gènes *ob* et *ob-R* sont aussi responsables de grands désordres de la fonction de la reproduction, pouvant se manifester par une absence de puberté, une aménorrhée primaire chez la femme

• 120 •

et un hypogonadisme chez l'homme (Caprio, 2004). L'ensemble de ces données indique que le système ob/ob-R est indispensable à la mise en place et au maintien de la fonction reproductrice. Chez la femme, plusieurs études ont démontré que la leptine agit sur de nombreux processus impliquant l'axe hypothalamo-hypophysaire, l'ovaire, l'endomètre et le placenta.

- Leptine et axe hypothalamo-hypophysaire. La survenue de la puberté est précédée chez l'Homme comme chez d'autres espèces, par une augmentation des taux de leptine circulante. Chez le garçon, parallèlement à l'augmentation de la testostéronémie, la leptinémie chute progressivement et revient à son niveau d'avant la puberté. Chez la fille, l'augmentation de la concentration plasmatique de leptine est continue, accompagnant la hausse des taux d'œstrogènes circulants. Cet effet initiateur de la puberté par la leptine semble être associé à son rôle sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. Il est notamment décrit que cette adipokine favorise la sécrétion de GnRH (gonadotrophine releasing hormone) par les neurones hypothalamiques, contribuant à augmenter la sécrétion des hormones gonadotropes hypophysaires : la FSH (follicle stimulating hormone) et la LH (luteinizing hormone). La leptine augmente également la fréquence et l'amplitude des pulses de LH (Caron *et al.*, 2008).
- Leptine et ovaires. L'expression élevée du gène *ob-R* dans les cellules ovariennes suggère un rôle direct de la leptine dans cet organe. En effet, il a été démontré que la leptine inhibe la stéroïdogénèse, en particulier la synthèse d'œstrogènes par les cellules de la granulosa et la synthèse d'androgènes par les cellules de la thèque de manière dose dépendante (Zachow and Magoffin, 1997; Spicer and Francisco, 1998). De plus, la leptine (à dose physiologique) favorise la maturation méiotique de l'ovocyte. Elle améliore également le taux de fécondation *in vitro* et le développement embryonnaire préimplantatoire chez la souris. Ces effets semblent être réalisés par la voie MAPK associée à la prolifération cellulaire (Ye *et al.*, 2009).
- Leptine et endomètre. Il a été démontré que la leptine freine la décidualisation des cellules endométriales stromales *in vitro* (Tanaka *et al.*, 2003). Elle serait également impliquée dans le phénomène de réceptivité endométriale. En effet, chez la souris, un traitement *in vitro* de cellules endométriales par la leptine stimule la production de molécules favorisant les contacts cellulaires avec l'embryon, telles que l'intégrine β3, l'interleukine-1 et le LIF (leukemia inhibitory factor). De

plus, l'administration par voie intra-utérine d'un antagoniste de la leptine bloque l'adhésion blastocyste-endomètre chez ces animaux (Ramos *et al.*, 2005).

Leptine et placenta. La leptine est considérée comme une véritable hormone placentaire (Señarís et al., 1997). Elle est sécrétée par le syncytiotrophoblaste tout au long de la grossesse. Le placenta exprime également le récepteur ob-R, suggérant un rôle autocrine de la leptine dans la physiologie placentaire. Elle stimule la prolifération et inhibe l'apoptose des cellules trophoblastiques humaines en empruntant la voie MAPK (D'Ippolito *et al.*, 2012). La leptine est également impliquée dans la régulation du processus d'invasion trophoblastique (Schulz *et al.*, 2007). Cet effet est associé à un remaniement de l'activité des métalloprotéases (MMP-2 et MMP-9) (Castellucci *et al.*, 2000). Enfin, la leptine augmente l'expression des transporteurs de nutriments dans les cytotrophoblastes humains et murins, suggérant un rôle de cette adipokine dans le contrôle de la croissance fœtale (Lea *et al.*, 2000; Jansson *et al.*, 2003; Farley *et al.*, 2010; Boeke *et al.*, 2013; Rosario *et al.*, 2015; Tsai *et al.*, 2015).

## 2. La résistine

La résistine, identifiée en 2001 dans le tissu adipeux blanc d'un modèle de souris obèse, tire son nom de son **action insulino-résistante**. Elle est classée dans la famille des protéines FIZZ (found in inflamatory zone) et est également appelée FIZZ3. Chez l'Homme, la résistine est essentiellement produite par les macrophages mais également par les adipocytes, la moelle osseuse, le muscle squelettique, l'intestin, l'estomac, l'hypothalamus, l'hypophyse, l'utérus et le placenta (Patel *et al.*, 2003; Al-Suhaimi and Shehzad, 2013; Rak *et al.*, 2017). Localisé sur le chromosome 19, le gène de la résistine code une protéine de 12,5 kDa (114 acides aminés) chez l'espèce humaine. Comme pour la leptine, les taux de résistine circulants sont plus élevés chez les individus obèses qu'au sein de la population normo-pondérée (Nieva-Vazquez *et al.*, 2014).

Les rôles et les mécanismes d'action de la résistine sont peu connus. Notamment, aucun récepteur spécifique de cette adipokine n'a été décrit à ce jour. Cependant, des études ont démontré que la résistine exerce son **rôle insulino-résistant** suite à sa fixation au **récepteur TLR4** (toll-like receptor 4) et à

• 122 •

l'induction des voies PI3K, ERK (extracellular signal-regulated kinase) et JNK (jun N-terminal kinase) bloquant ainsi la voie de signalisation de l'insuline dans l'hypothalamus murin (Benomar et al., 2013). De plus, en se liant à ce même récepteur, la résistine favorise la lipogenèse dans les adipocytes en augmentant l'expression de l'acide-gras synthase et de l'acetyl-coA carboxylase sous l'induction du facteur transcriptionnel ChREBP (carbohydrate-responsive element-binding protein) (Ikeda et al., 2013). Enfin, *via* le récepteur TLR4, la résistine favorise également la néoglucogenèse hépatique (Banerjee et al., 2004).

En se liant à un autre **récepteur ROR1** (receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1) et en activant la voie MAPK, la résistine stimule l'**adipogenèse** (Sánchez-Solana *et al.*, 2012). Enfin, la résistine peut se lier au **récepteur CAP1** (adenylyl cyclase-associated protein 1) dans les macrophages et activer les voies PKA et NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B) (Lee *et al.*, 2014). Elle stimule ainsi la production de cytokines telles que l'interleukine-6 (Silswal *et al.*, 2005) et le TNF- $\alpha$  et exerce un effet **proinflammatoire** et potentiellement **athérogène**.

De plus en plus, l'insulino-résistance est considérée par la communauté scientifique comme le lien entre l'obésité et l'infertilité. Dans ce contexte, les facteurs adipocytaires perturbant la signalisation de l'insuline tels que la résistine, constituent des cibles thérapeutiques de premier plan. Cependant, les études concernant les rôles de la résistine sur le fonctionnement de l'appareil reproducteur féminin restent extrêmement parcellaires.

Résistine et ovaires. Le rôle de la résistine sur la stéroïdogénèse ovarienne a été décrit, notamment chez l'espèce humaine. Plusieurs études démontrent que la résistine diminue la production d'œstradiol et de progestérone par les cellules de la granulosa, en inhibant l'expression d'enzymes clés de cette voie de synthèse, par la voie MAPK (Reverchon *et al.*, 2013b). En revanche, en induisant une augmentation de la production d'androgènes, la résistine pourrait être impliquée dans des pathologies associées à un hyperandrogénisme tel que le syndrome des ovaires polykystiques (Munir *et al.*, 2005).

- Résistine et endomètre. Une équipe a étudié le lien entre les facteurs sécrétés par les adipocytes et la maturation de l'endomètre. Des cellules endométriales ont été cultivées en présence de milieux conditionnés issus de pré-adipocytes (faible sécrétion de résistine) et d'adipocytes différenciés (forte sécrétion de résistine). En présence de milieux riches en résistine (issus d'adipocytes différenciés), il a été observé une augmentation de l'expression des gènes codant la protéine LIF et la glutathione peroxydase-3. Ces deux gènes sont impliqués dans la réceptivité utérine (Gamundi-Segura *et al.*, 2015). Cette étude suggère donc que la résistine favorise la mise en place de la réceptivité utérine.
- Résistine et placenta. La résistine est exprimée par le placenta. Cette expression augmente à la fin de la grossesse. Les taux de résistine sériques sont ainsi comparables chez la femme non-enceinte et la femme enceinte au cours du premier et du deuxième trimestre de grossesse. Ce n'est qu'à partir du troisième trimestre qu'une élévation des taux de résistine est mesurée dans le sang maternel (Xu *et al.*, 2005). Dans le placenta humain, la résistine stimule l'entrée du glucose, en augmentant l'expression du transporteur GLUT1 (glucose transporter 1) *via* la voie MAPK (Di Simone *et al.*, 2009). Ces résultats suggèrent que la résistine pourrait être impliquée dans le contrôle de l'apport nutritif au fœtus *via* le placenta.

## 3. La chémérine

La chémérine a été identifiée en 1997 dans les kératinocytes de l'épiderme où son expression est diminuée dans le cas de lésions psoriasiques (Nagpal *et al.*, 1997). En 2003, ses **propriétés chémoattractantes** ont été découvertes. En effet, elle exerce un rôle dans le guidage des cellules immunitaires vers les sites d'inflammation (Wittamer *et al.*, 2003). Elle est exprimée dans de nombreux organes tels que le placenta et le foie et dans une moindre mesure, le poumon, le cœur, le rein, l'ovaire et le pancréas (Înci *et al.*, 2016). Ce n'est qu'en 2007 que la chémérine fut considérée comme une adipokine, suite à sa découverte dans le tissu adipeux (Goralski *et al.*, 2007). Les taux de chémérine circulants sont augmentés chez les personnes souffrant d'obésité et de pathologies métaboliques associées (Bozaoglu *et al.*, 2007). La chémérine est codée par le gène *RARRES2* (retinoic acid receptor responder 2) situé sur le chromosome 7. Après le clivage de sa séquence peptidique signale, la

prochémérine (ou chémérine-163S) est sécrétée dans la circulation sanguine. Un second clivage réalisé à l'extrémité C-terminale achève la maturation de la protéine (Wittamer *et al.*, 2005). Différents sites C-terminaux protéolytiques ont été mis en évidence et sont à l'origine de plusieurs isoformes de la chémérine (**Figure 35**).



Figure 35. Modifications post-traductionnelles de la chémérine.

D'après Ferland *et al.* 2015. Une fois libérée par la cellule sécrétrice, la prochémérine est activée suite au clivage de sa séquence C-terminale, par diverses protéases inflammatoires (présentées en vert). Certaines formes de la protéine, notamment les formes chémérine-155A et chémérine-154F restent cependant inactives.

La chémérine exerce ses effets intracellulaires en se liant à trois récepteurs couplés aux protéines G. Le **récepteur CMKLR1** (chemokine-like receptor 1) est exprimé dans de nombreux tissus, notamment les cellules immunitaires et les adipocytes. Il possède une grande affinité pour la chémérine-156F et la chémérine-157S (Mattern *et al.*, 2014). La liaison chémérine-CMKLR1 induit l'activation des voies de signalisation MAPK, NF-KB et PI3K. En revanche, cette liaison inhibe la voie de l'AMPK (Reverchon, 2015). Le **récepteur GPR1** (G protein-coupled receptor 1) a été découvert dans les cellules de l'hippocampe humain. Il est également exprimé dans l'ovaire et le tissu adipeux. Il présente 40% d'homologie avec le récepteur CMKLR1 (De Henau *et al.*, 2016). La liaison de la chémérine à GPR1

induit une inhibition de sa propre sécrétion, suggérant que GPR1 contrôle directement la quantité extracellulaire de cette adipokine (Barnea *et al.*, 2008). Enfin, la chémérine, se lie au **récepteur CCRL2** (C-chemokine receptor-like 2) sans activer de voies de signalisation intracellulaire. Il semble que CCRL2 jouerait un rôle important dans la présentation de la chémérine aux cellules avoisinantes qui exprime le récepteur CMKLR1 (De Henau *et al.*, 2016).

Comme de nombreuses adipokines, la chémérine est impliquée dans la régulation du **métabolisme glucido-lipidique**, spécifiquement suite à sa fixation au récepteur CMKLR1. L'invalidation des gènes *RARRES2* ou *CMKLR1* dans l'adipocyte entraîne une réduction des expressions du transporteur de glucose GLUT4 et de la lipase hormono-sensible (Goralski *et al.*, 2007). La chémérine semble donc fortement impliquée dans l'entrée du glucose et dans la lipogenèse adipocytaires. Quelques données suggèrent que la chémérine est également impliquée dans la fonction de reproduction féminine.

- Chémérine et ovaires. L'effet de la chémérine sur l'axe hypothalamo-hypophysaire reste inconnu à ce jour. En revanche, il est décrit que la chémérine inhibe la production d'œstradiol et de progestérone par les follicules, en contrôlant l'expression des gènes codant les enzymes de la voie de biosynthèse des stéroïdes. La chémérine induit également un effet pro-apoptotique sur les cellules de la granulosa. En outre, elle bloque la maturation folliculaire et ovocytaire. Ces effets sont observés suite à la liaison de la chémérine au récepteur CMKLR1 et à l'inhibition de la voie MAPK (Reverchon *et al.*, 2014). De la même manière que la résistine, la chémérine apparaît comme un facteur favorisant la survenue de pathologies liées à un hyperandrogénisme tel que le syndrome des ovaires polykystiques. En effet, les femmes souffrant de ce syndrome présentent des taux de chémérine circulants augmentés (Wang *et al.*, 2013).
- Chémérine et grossesse. Une augmentation des taux de chémérine circulants est observée chez les femmes enceintes (Garces *et al.*, 2013). De plus, les femmes souffrant de pré-éclampsie présentent une élévation de la concentration en chémérine sérique, suggérant un rôle important de cette adipokine au cours de la grossesse (Duan *et al.*, 2011). Cependant, aucune étude n'a évalué les effets directs de la chémérine dans le placenta ou dans l'endomètre.

### 4. La visfatine

La visfatine, découverte en 2005, tire son nom de l'anglais « *visceral fat* ». En effet, cette adipokine est principalement sécrétée par le tissu adipeux viscéral. En réalité, la visfatine a été identifiée dès 1994 et nommée PBEF (pre-B cell colony-enhancing factor) (Samal *et al.*, 1994). Exprimée par les cellules souches de la moelle osseuse et les lymphocytes, l'étude des rôles de PBEF s'est naturellement orientée vers son implication dans la régulation de l'**inflammation** et de l'**immunité**. Ce n'est que plus tard que l'association positive entre les taux circulants de PBEF et la masse grasse a été établie (Fukuhara *et al.*, 2005). Codée par le gène *PBEF1* situé sur le chromosome 7, la visfatine est une protéine de 52 kDa (491 acides aminés). Elle est également exprimée dans le muscle, le foie, le cœur et le rein (Saddi-Rosa *et al.*, 2010) où elle exerce des effets autocrine, paracrine et endocrine.

Aujourd'hui, la visfatine est décrite comme une adipokine **pro-inflammatoire** et **athérogène**. En effet, elle favorise la libération du TNF- $\alpha$  et des interleukines IL-6 et IL-1 $\beta$  par l'activation de la voie du NF- $\kappa$ B dans les monocytes (Moschen *et al.*, 2007). Elle exerce également un rôle **prolifératif** et **antiapoptotique** *via* la voie MAPK dans les cellules cancéreuses prostatiques et hépatiques. Parallèlement, elle stimule les **propriétés angiogéniques** des cellules endothéliales. Son implication dans la survenue et l'agressivité des cancers est donc fortement envisagée (Bi and Che, 2010). Enfin, elle possède une activité enzymatique impliquée dans la voie de synthèse du NAD (nicotinamide adénine dinucléotide). Ce coenzyme régule de nombreuses fonctions cellulaires (Revollo *et al.*, 2007) dont le **métabolisme énergétique** (notamment les réactions d'oxydo-réduction de la chaîne respiratoire), la **régulation transcriptionnelle** (par la désacétylation des histones) ou encore la **communication** et la **signalisation cellulaires**.

Chez des souris présentant une mutation du gène de la visfatine, il est observé des défauts de régulation de la glycémie et une faible sécrétion d'insuline. L'administration de visfatine ou de NAD, restaure la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  du pancréas (Revollo *et al.*, 2007). A ce jour, aucun récepteur de la visfatine n'a été identifié, bien que le récepteur de l'insuline soit un temps envisagé comme potentiel candidat. En effet, la visfatine est capable d'induire la phosphorylation du résidu tyrosine des protéines IRS-1 et IRS-2 (insulin receptor substrate 1 and 2) et l'activation des voies PI3K et MAPK (Fukuhara

*et al.*, 2005). La visfatine exerce donc une **action insulino-sensibilisatrice** dans l'organisme d'une part en favorisant la sécrétion de l'hormone et d'autre part en mimant les effets de cette hormone.

Cantonnée à son rôle de cytokine pro-inflammatoire et immunomodulatrice, l'étude de l'implication de la visfatine dans la fonction reproductrice a longtemps été délaissée. Ce n'est que ces dernières années que les premiers travaux ont été réalisés.

- Visfatine et ovaires. Il a tout d'abord été démontré chez des femmes subissant une ponction ovocytaire, que la concentration en visfatine dans le liquide folliculaire est positivement corrélée au nombre d'ovocytes recueillis, suggérant un effet de cette adipokine sur le développement de l'ovocyte (Shen *et al.*, 2010). Il a été par la suite démontré que l'administration de visfatine chez la souris améliore la maturation ovocytaire, le développement embryonnaire et la fertilité générale (Choi *et al.*, 2012). La visfatine stimule également la synthèse d'œstradiol et de progestérone par les cellules de la granulosa et induit la prolifération cellulaire. La voie AMPK et celle de la PI3K semblent être impliquées dans ces effets (Reverchon *et al.*, 2013a).
- Visfatine et grossesse. La concentration circulante de visfatine semble fluctuer au cours de la grossesse et atteindre un pic à la fin du deuxième trimestre (Mazaki-Tovi *et al.*, 2009a). Les taux plasmatiques de visfatine ont été corrélés positivement avec le poids du fœtus à la naissance et semblent être également augmentés chez les femmes développant un diabète gestationnel (Mazaki-Tovi *et al.*, 2009b). Cependant aucune étude ne s'est intéressée au rôle de la visfatine dans la physiologie placentaire ou endométriale.

Les adipokines exercent des effets pléiotropes *via* l'activation de nombreuses voies de signalisation communes (MAPK, PI3K, AMPK, PKA, NF-kB). Leur action peut se révéler antagoniste ou synergique notamment lors de la régulation du **cycle cellulaire** (pro/anti-prolifératives, pro/anti-apoptotiques) et du **processus inflammatoire** (pro/anti-inflammatoire). Les **rôles métaboliques** des adipokines sont eux aussi très variés (insulino-résistantes, insulino-sensibilisatrices voire insulino-mimétiques). Parallèlement de plus en plus d'adipokines sont étudiées, telles que l'apeline et l'omentine. Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à une autre adipokine : l'**adiponectine**.

• 128 •

# C. L'adiponectine

#### 1. Découverte de l'adiponectine

Entre novembre 1995 et octobre 1996, quatre équipes différentes publient leurs résultats relatifs à la découverte d'un facteur produit par le tissu adipeux. Celui-ci fut alors nommé sous quatre appellations différentes. Le terme « **adiponectine** » n'est apparu qu'à partir de 1999 suite à l'alignement des séquences nucléotidiques de ces quatre facteurs (Arita *et al.*, 1999a).

- Novembre 1995. <u>The Journal of Biochemical Chemistry</u>. Consécutivement à la découverte récente de facteurs sécrétés par le tissu adipeux (adipsine, leptine, TNF-α), la sécrétion d'une protéine structurellement proche du facteur C1q du complément est mise en évidence dans l'adipocyte murin. D'une taille de 30 kDa, elle est nommée ACRP30 (adipocyte complement related protein of 30 kDa). Dans cette étude, les auteurs démontrent également que l'expression de la protéine ACRP30 est induite (× 100) au cours de l'adipogenèse (Scherer *et al.*, 1995).
- Avril 1996. <u>Biochemical and Biophysical Research Communications</u>. Au Japon, le programme de séquençage du génome humain (Japanese Human Genome Project) étudie l'expression des gènes d'une soixantaine de types cellulaires. Un nouveau gène, dont le transcrit est spécifiquement présent dans le tissu adipeux est identifié. Il est nommé *apM1* (adipose most abundant gene transcript 1), son transcrit étant le plus abondamment retrouvé dans ce tissu (Maeda *et al.*, 1996).
- Mai 1996. <u>The Journal of Biochemical Chemistry</u>. Une banque d'ARN messagers issus d'adipocytes murins a permis d'identifier la séquence codante et la structure du transcrit *adipoQ*. Ce facteur présente une séquence signale hydrophobe, un domaine collagène et un domaine globulaire. Son expression est diminuée en cas d'obésité chez la souris *ob/ob* et chez l'Homme (Hu *et al.*, 1996).
- Octobre 1996. *Journal of Biochemistry*. A partir de plasma humain, une protéine de 28 kDa (244 acides aminés) est purifiée par la technique de chromatographie d'affinité (gélatine/cellulophine). Elle est alors nommée GBP28 (gelatin binding protein of 28 kDa) bien que ses capacités à fixer la gélatine soient plus tard infirmées. Ce travail démontre que GBP28 est capable de se polymériser. L'hypothèse d'un rôle sur le métabolisme lipidique est fortement envisagée (Nakano *et al.*, 1996).

## 2. Structure du gène de l'adiponectine

Le gène *apM1* est situé sur le chromosome 3 humain et plus précisément sur le locus 3q27 (Takahashi *et al.*, 2000). De manière intéressante, plusieurs études décrivent ce locus comme une région de prédisposition au diabète de type 2 et au syndrome métabolique (Kissebah *et al.*, 2000; Vionnet *et al.*, 2000). Il s'agit d'un gène de 16 kb constitué de trois exons et deux introns (**Figure 36**), présentant des homologies de séquences avec les gènes codant le collagène VIII, le collagène X et le facteur C1q du complément (Takahashi *et al.*, 2000). Le transcrit possède une taille de 4,5 kb (Maeda *et al.*, 1996). Le codon initiateur de la traduction (ATG) est situé dans l'exon 2 (Lacquemant *et al.*, 2003).

Plusieurs régions régulatrices de l'expression du gène *apM1* ont été identifiées dans une région promotrice du gène encadrant l'exon 1. A l'inverse de nombreux gènes, le promoteur de *apM1* ne comporte pas de séquence TATA, mais présente des éléments de réponse à de nombreux facteurs transcriptionnels (Liu and Liu, 2010) décrits dans la **Figure 36**. L'activité transcriptionnelle du gène de l'adiponectine est donc régulée par de nombreux mécanismes. Les différents mécanismes de régulation de l'expression de l'adiponectine seront développés ultérieurement dans la **partie D** de ce chapitre.



#### Figure 36. Structure du gène de l'adiponectine et de sa région promotrice.

Modifié d'après Liu *et al.* 2010. Le gène de l'adiponectine, apM1, est composé de trois exons et deux introns. La région promotrice située entre -2667 et +41 présente de nombreux éléments de réponses où se fixent divers facteurs de transcription qui régulent l'expression du gène.

#### 3. Structure de la protéine

L'adiponectine humaine est une protéine de 244 acides aminés présentant quatre domaines protéiques. A l'extrémité N-terminale, se situe une **séquence signale** de 18 acides aminés qui sera clivée dans le réticulum endoplasmique au cours de la maturation de l'adiponectine (Fumeron, 2004). Cette séquence signale est spécifique des protéines sécrétées (Hu *et al.*, 1996). Elle est suivie d'une **séquence hypervariable** selon les espèces, de 23 acides aminés chez l'Homme et d'un **domaine collagène** de 66 acides aminés, constitué de 22 répétitions du motif (Glycine-X-Y) où X et Y sont des acides aminés variables (Hu *et al.*, 1996). Enfin, un domaine globulaire de 137 acides aminés impliqués dans la liaison de l'adiponectine à son récepteur, occupe l'extrémité C-terminale. La protéine est alors dite sous sa **forme longue**. En effet, il existe une **forme courte** de l'adiponectine, issue du clivage réalisé par une élastase sécrétée par les monocytes et les neutrophiles. Plusieurs sites protéolytiques ont été décrits, situés au sein de la séquence variable et du domaine collagène. L'adiponectine sous la forme courte préserve donc son domaine globulaire intègre et peut exercer ses effets en se fixant à son récepteur (Waki *et al.*, 2005) (**Figure 37**).





#### Figure 37. Structure de l'adiponectine.

Modifié d'après Goldstein *et al.* 2009. L'adiponectine sous sa forme longue présente quatre domaines protéiques (séquences signale, variable, collagène, globulaire). Le domaine globulaire est responsable des effets physiologiques de l'adiponectine. Il existe une forme courte de l'adiponectine issue du clivage de la forme longue par la leucocyte élastase.

Dans la circulation sanguine, l'adiponectine sous forme de monomère n'est jamais observée. La **polymérisation** est donc un mécanisme essentiel dans la régulation de l'activité biologique de la protéine (Wang *et al.*, 2008). Ainsi, l'adiponectine forme des trimères (forme de faible poids moléculaire ou **LMW**) suite à la mise en place de liaisons hydrophobes entre les domaines globulaires et

d'interactions non-covalentes au sein des hélices  $\alpha$  des domaines collagènes (Shapiro and Scherer, 1998). La forme courte de la protéine ne se polymérise pas davantage (Wang et al., 2006). En revanche, sous sa forme longue, les trimères d'adiponectine forment des hexamères (forme de poids moléculaire intermédiaire ou MMW) et des structures beaucoup plus complexes composées de 18 monomères ou plus (forme de haut poids moléculaire ou HMW) (Waki et al., 2003; Wedellova et al., 2013). Cette polymérisation de l'adiponectine nécessite des modifications post-traductionnelles. En effet, la formation des hexamères est réalisée par la mise en place de **ponts disulfure** entre deux cystéines situées dans la région variable de l'adiponectine (Cys-36), impliquant les protéines du réticulum endoplasmique ERp44 (endoplasmic reticulum protein of 44 kDa) et ERo1-L $\alpha$  (endoplasmic reticulum oxidoreductase-1-like alpha). De plus, quatre lysines (Lys-65, Lys-68, Lys-77, Lys-101) et quatre prolines (Pro-44, Pro-47, Pro-53, Pro-91) hautement conservées au cours du processus évolutif, subissent une réaction d'hydroxylation (ajout d'un groupement -OH). Les quatre hydroxylysines sont ensuite modifiées par glycosylation suite à l'ajout d'un groupe glucidique glycosyl- $\alpha$ (1-2)-galactosyl (Figure 38). La lysyl hydroxylase-3 (LH-3) qui présente des fonctions glycosyltransferase et galactosyltransferase semble être impliquée dans la mise en place de ces modifications post-traductionnelles de l'adiponectine (Wang et al., 2008).





Modifié d'après Wang *et al.* 2008. La cystéine-36 de la séquence variable permet la formation d'hexamères *via* la création de ponts disulfures. Le domaine collagène de l'adiponectine présente une répétition de 22 motifs (G-X-Y) très conservés au sein des espèces. Quatre lysines et quatre prolines subissent une réaction d'hydroxylation suivie ou non d'une glycosylation impliquées dans l'assemblage et la sécrétion de la forme HMW de l'adiponectine.

Ces **modifications post-traductionnelles** semblent être indispensables à la polymérisation de la protéine. En effet, lorsque les lysines sont remplacées par des arginines, la forme HMW de la protéine est indétectable dans la circulation (Wang *et al.*, 2006). De la même manière, l'inhibition pharmacologique des réactions de glycosylation et hydroxylation perturbe l'assemblage et la sécrétion des formes polymériques de l'adiponectine (Richards *et al.*, 2006). Enfin, il a été démontré que ces modifications post-traductionnelles seraient également impliquées dans les mécanismes de sécrétion de l'adiponectine (Wang *et al.*, 2008).

L'adiponectine est considérée comme l'adipokine la plus largement présente dans la circulation sanguine. Elle circule à des taux relativement importants pour une hormone (3 à 30 µg/ml) représentant ainsi 0,01% des protéines plasmatiques totales (Swarbrick and Havel, 2008). Les formes MMW et HMW représentent 90% de la protéine dans la circulation et la forme LMW ne représente que les 10% restants (Combs and Marliss, 2014). La forme globulaire reste extrêmement minoritaire (Waki *et al.*, 2003). L'expression de l'adiponectine dans l'organisme est étroitement liée à de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques. En effet, diverses molécules régulatrices ont été identifiées au cours de ces dernières années.

# D. Mécanismes de régulation de l'expression de l'adiponectine

### 1. Les facteurs de transcription

Comme décrit dans la Figure 34, la séquence promotrice du gène *apM1* codant l'adiponectine humaine présente des sites de liaison pour de nombreux facteurs de transcription.

PPARγ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma). L'invalidation du gène codant ce facteur de transcription dans le tissu adipeux murin induit une réduction des taux plasmatiques d'adiponectine (He *et al.*, 2003). De la même façon, chez l'Homme, la présence d'une forme mutée de PPARγ diminuant son activité transcriptionnelle, est associée à une réduction des taux d'adiponectine sériques (Yamamoto *et al.*, 2002). Il a été démontré que PPARγ module **positivement** l'expression de *apM1* en se fixant à la séquence PPRE (PPAR-responsive element) située dans la région -273/-285 de son promoteur (Iwaki *et al.*, 2003).

- C/EBPα (CCAAT/enhancer-binding protein alpha). L'expression du gène *apM1* est augmentée lorsque l'activité transcriptionnelle de C/EBPα est stimulée. A l'inverse, l'inhibition de l'expression de ce facteur entraîne une réduction de l'expression du gène de l'adiponectine. Plusieurs sites de réponse à C/EBP (séquences CCAAT) ont été identifiés dans le promoteur du gène dont l'un d'entre eux est intra-intronique (Qiao *et al.*, 2005).
- LRH-1 (liver receptor homolog-1). Le facteur de transcription LRH-1 se lie à la séquence LRH-RE (LRH-responsive element) identifiée dans la région -237/-229 de la région promotrice. LRH-1 stimule l'expression du gène de l'adiponectine (Iwaki *et al.*, 2003).
- FoxO1 (forkhead box O1). L'activation de FoxO1 requiert sa désacétylation par la protéine SIRT1 (sirtuin 1). La suractivation de FoxO1 induit une augmentation de l'expression de l'adiponectine, notamment par son interaction avec la protéine C/EBPα (Qiao and Shao, 2006).
- SREBP-1c (sterol-regulatory element-binding protein 1c). Le facteur de transcription SREBP-1c induit l'expression du gène de l'adiponectine en se fixant à l'une des deux séquences SRE (sterol regulatory element) du promoteur, identifiées dans la région -431/-423 (Seo *et al.*, 2004). Il peut également interagir avec les nombreuses séquences E-box présentes dans le promoteur (Doran *et al.*, 2008).
- CREB (cAMP response element-binding protein). L'invalidation du facteur CREB dans les adipocytes entraîne une augmentation des taux plasmatiques d'adiponectine, suggérant un effet négatif de ce facteur sur l'expression de cette adipokine (Qi *et al.*, 2009). Cependant, CREB ne se fixe pas directement au promoteur du gène. Il active un facteur de transcription inhibiteur, appelé ATF3 (activating transcription factor 3) qui lui-même se lit à un site AP-1 (activator protein-1) (Kim *et al.*, 2006).
- NFATc4 (nuclear factor of activated T-cells 4). Le facteur NFATc4 inhibe la transcription du gène de l'adiponectine en se fixant à une séquence voisine de la séquence AP-1 (Kim *et al.*, 2006).

• 134 •

Id3 (inhibitor of differentiation 3). Le facteur Id3 est également un inhibiteur du gène *apM1*. Il se lie à la protéine E47, un co-activateur de la protéine SREBP1c et prévient leur fixation aux séquences E-box de la région promotrice (Doran *et al.*, 2008).

L'activation de ces facteurs de transcription est finement régulée par des signaux **endogènes** et **exogènes** induisant l'activation de nombreuses voies de signalisation dans la cellule sécrétrice.

#### 2. Le statut métabolique

Une corrélation négative entre l'expression d'adiponectine et la masse adipeuse a été mise en évidence très tôt au cours de sa découverte. En effet, les individus obèses présentent une hypoadiponectinémie (Hu *et al.*, 1996). Cette association négative s'est étendue aux maladies métaboliques telles que le diabète de type 2 et diverses maladies cardiovasculaires (hypertension, maladies coronariennes) (Arita *et al.*, 1999b; Adamczak *et al.*, 2003; Kumada *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*, 2014). Ces données suggèrent que l'expression de l'adiponectine est dépendante du métabolisme général de l'organisme.

#### ✤ <u>L'insuline</u>

Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune associée à la destruction des cellules  $\beta$  du pancréas et donc à une absence totale de production d'insuline. Dans cette pathologie, les individus atteints présentent des taux d'adiponectine circulants plus élevés comparativement aux individus sains (Imagawa *et al.*, 2002). A l'inverse, les patients souffrant de diabète de type 2 développent fréquemment une insulino-résistance à l'origine d'une hyperinsulinémie. Ces patients présentent une hypoadiponectinémie (Weyer *et al.*, 2001; Basu *et al.*, 2007). Ces résultats suggèrent que l'insuline induit une réduction d'expression et de sécrétion de l'adiponectine. Cependant, l'**hétérogénéité des données** ne permet pas de véritablement affirmer ce lien. En effet, dans la même étude que citée précédemment, les patients souffrant de diabète de type 1 qui ont subi une insulinothérapie pendant deux ans, ne présentent aucune variation des taux sériques d'adiponectine avant et après l'administration d'insuline (Imagawa *et al.*, 2002).

De la même manière, des **résultats contradictoires** sont observés *in vitro*. Certaines études démontrent que l'insuline stimule la sécrétion d'adiponectine (Scherer *et al.*, 1995; Blümer *et al.*, 2008) alors que

• 135 •

d'autres rendent compte d'une diminution de la production d'adiponectine en présence d'insuline (Fasshauer *et al.*, 2002). A ce jour, il n'y a donc pas de réel consensus quant aux effets de l'insuline sur la production de cette adipokine.

# ✤ <u>L'apport calorique</u>

Au cours de la période post-prandiale, un pic de glycémie rapidement accompagné d'un pic d'insulinémie est observé chez les sujets sains, généralement 30 minutes après le repas (**Figure 39**). Cependant, **aucune variation** d'adiponectinémie n'a été mesurée au cours de cette période, suite à cet **apport calorique** (Imbeault *et al.*, 2004; Rubin *et al.*, 2008).



**Figure 39. Variation des taux d'adiponectine au cours de la période post-prandiale.** Modifié d'après Imbeault et al. 2004. Après la prise d'un repas, les taux plasmatiques d'adiponectine restent constants et ne suivent pas les variations caractéristiques d'insulinémie et de glycémie.

En revanche, une **augmentation** de l'expression et de la sécrétion d'adiponectine par le tissu adipeux est observée, suite à une **restriction calorique**. De même, chez le rat, une période de restriction calorique de quatre mois, induit un doublement de l'expression du gène codant l'adiponectine (Ding *et al.*, 2012). De plus, chez l'Homme, l'expression du gène de l'adiponectine est fortement stimulée après une intervention chirurgicale de l'obésité (bypass gastrique). Les patients opérés présentent des taux circulants d'adiponectine similaires aux individus normo-pondérés (Chen *et al.*, 2012). Enfin, les patients souffrant d'anorexie présentent une hyperadiponectinémie (Delporte *et al.*, 2003).

• 136 •

## 3. Les facteurs de l'inflammation

L'obésité est caractérisée par une **inflammation systémique chronique**. En effet, le tissu adipeux des individus obèses produit de nombreuses molécules inflammatoires (cytokines, chémokines...). Ces facteurs sont issus d'une infiltration du tissu adipeux par des macrophages, des monocytes et des lymphocytes T. Ces médiateurs de l'inflammation sont impliqués dans le développement de nombreuses complications associées à l'obésité (insulino-résistance, diabète de type 2, athérosclérose) (Swarbrick and Havel, 2008; Bai and Sun, 2015).

#### Le facteur TNF-α

Plusieurs études ont démontré que le TNF- $\alpha$  **inhibe** l'expression de l'adiponectine en empruntant la voie JNK (Zappalà and Rechler, 2009; Chang *et al.*, 2014). Le TNF- $\alpha$  diminue ainsi l'expression de facteurs de transcription favorisant la production d'adiponectine tels que PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  et SREBP1c (Sewter *et al.*, 2002; Yanning Wang, 2009).

# \* Les interleukines IL-6 et IL-18

Les interleukines IL-6 et IL-18 exercent également une **action inhibitrice** sur l'expression et la sécrétion d'adiponectine. En effet, *via* l'action de la voie ERK et le facteur de transcription NFATc4, ces interleukines inhibent l'expression du gène de l'adiponectine (Liu and Liu, 2010).

# \* La protéine C réactive

La protéine C réactive semble induire une **régulation négative** de l'expression du gène de l'adiponectine suite à l'activation des voies PI3K et JNK (Yuan *et al.*, 2007; Kaneko *et al.*, 2011). Cependant les mécanismes de régulation sous-jacents restent méconnus.

#### 4. Les stress cellulaires

### \* Le stress oxydatif

Le stress oxydatif se définit comme l'augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) associée à l'incapacité du système antioxydant à les éliminer. Dans le cas de l'obésité et de l'insulino-résistance, le stress oxydatif est accru. La grande majorité des facteurs sécrétés par les adipocytes stimule la production de ces ROS (anion superoxyde, peroxyde d'hydrogène, radical hydroxyle). Le métabolisme lipidique (notamment les réactions de peroxydation) accentue le stress oxydatif (Swarbrick and Havel, 2008; Fernández-Sánchez *et al.*, 2011). Il a été démontré que le peroxyde d'hydrogène **réduit** très rapidement la transcription du gène *apM1* dans les adipocytes (Kamigaki *et al.*, 2006). Ces effets semblent associés à l'activation du facteur de transcription CHOP-10 (C/EBP homologous protein-10) qui empêche la liaison de C/EBP $\alpha$  à la séquence -117/-73 située dans la région promotrice du gène (Chevillotte *et al.*, 2007).

#### Le stress du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est le lieu de maturation des protéines sécrétées et membranaires. Dans cet organite, les protéines acquièrent leur structure finale suite à l'action de diverses protéines chaperonnes. Cependant, certaines protéines mal conformées sont produites par le RE et restent dans la lumière de l'organite. Lorsque les mécanismes moléculaires permettant de dégrader ces protéines ne sont plus suffisants, les protéines mal repliées s'accumulent dans la cellule et induisent un « **stress du RE** » (Garlatti and Barouki, 2002). Celui-ci est augmenté dans le contexte d'obésité. Bien que le lien ne soit pas véritablement établi, il semblerait que l'environnement pro-inflammatoire, le stress oxydatif et l'apport excessif en nutriments participent à sa mise en place (Gregor and Hotamisligil, 2007). Il a été démontré récemment que le stress du RE **inhibe** la production d'adiponectine *via* la voie JNK et l'inhibition du facteur de transcription PPAR<sub>Y</sub> (Liu and Liu, 2010).

#### 5. Les facteurs hormonaux

#### \* La testostérone

Concernant les taux d'adiponectine plasmatiques, un dimorphisme sexuel assez net est observé au sein de plusieurs espèces. Une étude a ainsi mesuré l'adiponectinémie chez plus de 600 hommes et femmes et observé une différence hautement significative entre les deux sexes (6  $\mu$ g/ml chez les hommes et 10  $\mu$ g/ml chez les femmes) (Nishizawa *et al.*, 2002). Chez les hommes souffrant d'hypogonadisme, des taux d'adiponectine plasmatiques élevés sont mesurés. Cependant, un traitement de substitution hormonale par la testostérone permet une réduction de l'adiponectinémie, à des taux semblables aux

individus sains (Lanfranco *et al.*, 2004). Cet **effet inhibiteur** de la testostérone sur la synthèse d'adiponectine a été confirmé chez le rat castré (Xu *et al.*, 2005). De plus, l'invalidation des récepteurs des androgènes (AR) chez des souris mâles (AR<sup>-/-</sup>) induit une augmentation de la sécrétion d'adiponectine et une inhibition de l'expression de PPAR $\gamma$  dans le tissus adipeux (Fan *et al.*, 2005). L'effet inhibiteur de la testostérone semble donc associé à l'expression du facteur de transcription PPAR $\gamma$ .

En revanche, aucune variation de l'adiponectinémie n'est observée chez la femme au cours du cycle menstruel ou après la ménopause. L'ensemble de ces résultats suggère que les androgènes seuls sont responsables de ce dimorphisme sexuel relatif aux taux d'adiponectine plasmatiques (Nishizawa *et al.*, 2002; Kleiblová *et al.*, 2006).

#### \* Le cortisol

Le syndrome de Cushing est associé à un hypercortisolisme chronique prédisposant l'individu à une obésité et une insulino-résistance. Les malades non-obèses présentent des taux d'adiponectine plus faible que les individus sains normo-pondérés, suggérant un **effet négatif** du cortisol sur la production d'adiponectine. En revanche, aucune différence n'est observée entre les individus obèses sains et ceux souffrant du syndrome de Cushing. Ces résultats supposent que l'obésité et toutes les dérégulations métaboliques associées masquent l'effet inhibiteur du cortisol sur l'expression de l'adiponectine (Fallo *et al.*, 2004). Chez la souris, l'administration d'un inhibiteur de la 11β-HSD1 (11β-hydroxysteroïde deshydrogenase type 1) qui catalyse la transformation de la cortisone en cortisol, induit une augmentation de la production d'adiponectine. Ces résultats sont donc en faveur de l'inhibition de la production d'adiponectine par le cortisol (Sundbom *et al.*, 2008).

## \* L'hormone de croissance (GH)

Des études réalisées *in vitro* démontrent que la GH **inhibe** la production d'adiponectine par des explants de tissus adipeux humains. Ces résultats ont été confirmés dans un modèle de souris transgéniques surexprimant le gène de la GH. Ces animaux présentent une hypoadiponectinémie comparativement aux souris sauvages (Nilsson *et al.*, 2005). Ces effets semblent être associés à l'activation de la voie PI3K (del Rincon *et al.*, 2007).

#### 6. Le système nerveux sympathique

Une stimulation excessive du système nerveux sympathique a été mise en évidence chez les sujets obèses. Cette hyperstimulation induit des effets délétères sur plusieurs organes tels que le cœur, les reins et les vaisseaux sanguins. Ce phénomène participe à la mise en place de l'insulino-résistance (Smith and Minson, 2012). Le rôle inhibiteur des catécholamines synthétisées par le système nerveux sympathique, sur la production d'adiponectine a donc été suspecté. Cette hypothèse a été testée par la mise en culture d'adipocytes en présence d'isoprotérénol, un agoniste des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. Les auteurs ont observé une **régulation négative** de l'expression de l'adiponectine *via* la voie de la PKA en présence d'isoprotérénol (Fasshauer *et al.*, 2001).

## 7. Les agents pharmacologiques

# \* Les traitements anti-diabétiques

La metformine est un anti-diabétique qui inhibe notamment la néoglucogenèse hépatique et le transport intestinal du glucose. Cependant, ces effets ne semblent pas impliquer l'adiponectine. En effet, les taux plasmatiques de l'adiponectine ne sont pas modifiés suite au traitement (Fujita *et al.*, 2005). En complément de la metformine, une classe d'anti-diabétiques a également été prescrite, les thiazolidinediones. Il s'agit d'**agonistes de PPAR** $\gamma$ . Il a été observé que la rosiglitazone et la pioglitazone induisent une augmentation de la sécrétion d'adiponectine (Majuri *et al.*, 2007; Kanda *et al.*, 2008). Cependant, leur faible efficacité a conduit à leur retrait du marché.

#### \* Les traitements anti-hypertensifs

Dans le cadre du traitement de l'hypertension, l'inhibition du système Rénine-Angiotensine-Aldostérone est utilisée. Il s'agit d'une part, d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I en angiotensine II et d'autre part, de bloqueurs du récepteur de l'angiotensine II. Ces molécules améliorent la sensibilité à l'insuline et semblent faire intervenir l'adiponectine. En effet, une augmentation des taux d'adiponectine circulants est observée au cours de ces traitements. Ces effets sont associés à une réduction de l'expression du TNF- $\alpha$  et semblent être réalisés par l'intermédiaire du facteur de transcription PPARy (Swarbrick and Havel, 2008).

#### Les traitements immunomodulateurs

L'inflixmab est un anticorps monoclonal fixant le TNF- $\alpha$  et limitant sa biodisponibilité. Il est prescrit pour le traitement de maladies inflammatoires chroniques (maladie de Crohn, psoriasis, spondylarthrite ankylosante...). Il a été observé que l'administration de cette molécule chez la souris bloque l'activation de la voie JNK induite par le TNF- $\alpha$  et restaure l'expression de l'adiponectine (Nacci *et al.*, 2016).

## 8. Les facteurs exogènes

Les taux d'adiponectine circulants varient assez peu au cours du **cycle circadien** (Gavrila *et al.*, 2003; Cizza *et al.*, 2010). Cependant, un pic de concentration de l'adiponectine au cours de la matinée et une chute progressive au cours de la nuit ont été observés. Les mécanismes de régulation ne sont pas connus. Chez l'Homme, l'exposition au **froid** diminue l'expression de l'adiponectine (Imbeault, 2007). Ces effets semblent être espèce-dépendants. En effet, la souris ne répond pas à ce stimulus. L'**hypoxie** inhibe également la production d'adiponectine (Chen *et al.*, 2006). Enfin, le comportement individuel participe lui aussi aux modifications de sécrétion de l'adiponectine. Ainsi, la consommation de **tabac** est un facteur inhibiteur de la production d'adiponectine (Iwashima *et al.*, 2005; Otsuka *et al.*, 2009) et la consommation d'**alcool** favorise sa sécrétion (Sierksma *et al.*, 2004).

Le régime alimentaire contribue lui aussi à moduler la production d'adiponectine. Le régime méditerranéen, notamment les antioxydants tels que le phénol hydroxytyrosol et l'acide oléique stimulent la production de l'adiponectine *via* l'augmentation de l'expression de PPAR $\gamma$  et la diminution du TNF- $\alpha$ . Ces effets semblent être réalisés par la voie de signalisation JNK (Scoditti *et al.*, 2015).

## 9. Autorégulation

Il a été observé que des souris transgéniques surexprimant la séquence codante de l'adiponectine présentent des taux circulants d'adiponectine diminués comparativement à des souris sauvages. Des études réalisées *in vitro* confirment que **l'adiponectine régule négativement l'expression de son propre gène**. Cet effet est associé à l'activation de la voie de l'AMPK (Bauche *et al.*, 2006).

En conclusion, l'expression de l'adiponectine est un **processus hautement régulé (Figure 40**). De nombreux facteurs associés à l'obésité (inflammation chronique, hypercortisolisme, stress cellulaires, stimulation excessive du système nerveux sympathique) exercent une **régulation négative** sur l'expression du gène de cette adipokine, influençant directement sa sécrétion. Les stratégies thérapeutiques (agents anti-diabétiques, anti-hypertensifs et immunomodulateurs) visant à contrer les effets de l'obésité contribuent ainsi à augmenter la production d'adiponectine.

## E. Le signal « Adiponectine »

Une fois présente dans la circulation sanguine, l'adiponectine exerce ses effets physiologiques en se fixant à des récepteurs membranaires qui lui sont spécifiques. Il en existe deux isoformes, **ADIPOR1** et **ADIPOR2**. L'adiponectine peut également se lier à la **T-cadhérine**.

# 1. Les récepteurs ADIPOR1 et ADIPOR2

Une première étude publiée en 2002 démontre que l'adiponectine induit des effets insulinosensibilisateurs dans le muscle et le foie. Cependant, seule la **forme longue** de la protéine permet d'induire ces effets dans le tissu hépatique. Il a ainsi été démontré que les cellules hépatiques possèdent une grande affinité pour la forme longue de l'adiponectine, alors que les cellules musculaires lient majoritairement la **forme globulaire** de cette adipokine (Yamauchi *et al.*, 2002). Dès 2003, l'utilisation de ces propriétés de liaison a permis d'isoler les deux récepteurs de l'adiponectine, ADIPOR1 et ADIPOR2 (Yamauchi *et al.*, 2003). ADIPOR1 est très exprimé dans le muscle et ADIPOR2 est plus abondamment exprimé dans le foie. Ces données suggèrent fortement que la forme courte de l'adiponectine se lie préférentiellement à ADIPOR1 et la forme longue, à ADIPOR2. Plus récemment, les deux isoformes ont été identifiées dans de nombreux types cellulaires (macrophages, hypothalamus, adipocytes, cellules vasculaires...) (Yamauchi *et al.*, 2014).


Figure 40. Régulation de la production et de la sécrétion d'adiponectine.

Le gène *ADIPOR1* est situé sur le chromosome 1, au locus 1p36. *ADIPOR2* est quant à lui situé sur le locus 12p13 du chromosome 12 (Yamauchi *et al.*, 2014). Les deux récepteurs ADIPOR présentent une homologie de séquence (67% de la séquence protéique) et de structure. Il s'agit de récepteurs à **sept domaines transmembranaires** dont la topologie est l'exact opposé de celle des récepteurs couplés aux protéines G. En effet, leur extrémité C-terminale est extracellulaire et l'extrémité N-terminale est cytoplasmique. Ils présentent un **motif de liaison au zinc** qui semble être indispensable à la transduction du signal dans le compartiment intracellulaire (Tanabe *et al.*, 2015).

#### 2. Les protéines APPL1 et APPL2

L'adiponectine induit l'activation de nombreuses voies de signalisation. Cependant, les récepteurs ADIPOR ne semblent pas présenter de domaine kinase ou de phosphorylation. En effet la mutagénèse ciblée des résidus tyrosine de ces récepteurs n'induit pas de perturbation de la signalisation adiponectine (Mao *et al.*, 2006). L'activation des voies de transduction suite à la liaison de l'adiponectine à son récepteur fait donc intervenir des molécules intermédiaires se liant aux ADIPOR en réponse à leur changement de conformation. La protéine **APPL1** (adaptor protein containing pleckstrin homology domain, phosphotyrosine binding domain and leucine zipper motif) a ainsi été identifiée comme une **protéine adaptatrice** pouvant se lier aux domaines intracellulaires des récepteurs ADIPOR1 et ADIPOR2 (Mao *et al.*, 2006). La liaison de la protéine APPL1 aux ADIPOR est régulée par une deuxième protéine adaptatrice, la protéine **APPL2**. En absence de signal adiponectine, APPL2 peut se fixer au domaine N-terminal du récepteur ADIPOR ou former un hétérodimère APPL1/APPL2 qui empêche la liaison APPL1/ADIPOR. En revanche, la liaison de l'adiponectine à ses récepteurs favorise la dissociation de cet hétérodimère. Ainsi les protéines APPL régulent le signal adiponectine selon le **modèle du Yin et du Yang** proposé par Wang *et al.* (Wang *et al.*, 2009; Ruan and Dong, 2016) (**Figure 41**).



**Figure 41. Modèle de régulation "Yin-Yang" du signal adiponectine par les protéines APPL.** Modifié d'après Wang et al. 2009. Lorsque l'adiponectine n'est pas liée à son récepteur, la protéine APPL2 empêche la liaison APPL1/ADIPOR, en séquestrant la protéine adaptatrice (formation d'un hétérodimère) ou en se liant elle-même au récepteur. L'adiponectine induit la dissociation du complexe APPL1/APPL2 et la liaison APPL1/ADIPOR permettant ainsi la transmission du signal dans la cellule.

#### 3. Les autres récepteurs de l'adiponectine

La protéine réceptrice T-cadhérine a été identifiée comme un récepteur des formes MMW et HMW de l'adiponectine (Hug *et al.*, 2004). Ce récepteur membranaire ne présente pas de domaine intracellulaire. Il semble donc que la T-cadhérine pourrait **contrôler la biodisponibilité** de l'adiponectine, plutôt que d'exercer des effets directs sur la voie de signalisation de la protéine (Yamauchi *et al.*, 2014). En effet, il a été observé que des souris déficientes pour le gène de la T-cadhérine présentent des taux d'adiponectine circulants augmentés, notamment de la forme HMW (Denzel *et al.*, 2010). Certaines données suggèrent également qu'il existe d'autres isoformes ADIPOR encore inconnus à ce jour. Des **effets ADIPOR-indépendants** de l'adiponectine ont été observés dans des cellules hypothalamiques n'exprimant par les récepteurs ADIPOR1 et ADIPOR2. De même, des macrophages dont l'expression de ADIPOR1, ADIPOR2 et de la T-cadhérine ont été invalidées par ARN interférents, présentent toujours des effets biologiques de l'adiponectine (Ruan and Dong, 2016).

#### 4. Les voies de signalisation régulées par l'adiponectine

En se liant à ADIPOR1 et ADIPOR2, l'adiponectine induit une **cascade de signalisation intracellulaire** responsable des effets pléiotropes de la protéine dans l'organisme. Ainsi, l'adiponectine régule l'homéostasie glucido-lipidique et le métabolisme énergétique, la prolifération, la mort et la différenciation cellulaires et également la réponse inflammatoire.

#### ✤ La voie de l'AMPK

L'AMPK (adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase) est considérée comme le **senseur métabolique** de la cellule, ajustant en permanence la balance entre les besoins et la disponibilité en énergie. Le maintien d'un ratio ATP/AMP positif (10/1) est un phénomène finement régulé et contribue à la survie cellulaire. Plusieurs stimuli peuvent induire l'activation de cette kinase, en particulier les stress énergétiques tels que l'effort physique, l'absence de glucose, l'hypoxie et l'ischémie. L'AMPK participe au maintien de l'**homéostasie énergétique** en contrôlant l'activité de certaines enzymes et/ou l'expression de gènes impliqués dans cette voie. Elle stimule ainsi les voies cataboliques productrices d'ATP ( $\beta$ -oxydation et glycolyse) et inhibe les voies anaboliques énergivores (protéogenèse, lipogenèse, néoglucogenèse, glycogénogenèse) (Foretz *et al.*, 2006).

L'AMPK est constituée de trois sous-unités ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ). La **sous-unité**  $\alpha$  contient le domaine kinase de l'enzyme (résidu Tyrosine-172). Elle possède également un domaine d'auto-inhibition, activé en absence d'AMP et deux domaines de liaisons aux sous-unités régulatrices  $\beta$  et  $\gamma$ . La **sous-unité**  $\beta$ possède elle aussi deux domaines de liaison aux sous-unités  $\alpha$  et  $\gamma$  permettant la formation d'un hétérotrimère et un domaine de liaison à la molécule de glycogène. La **sous-unité**  $\gamma$  possède une répétition de quatre domaines protéiques permettant la fixation de l'AMP (activateur) et de l'ATP (inhibiteur) (Foretz *et al.*, 2006).

L'activation de l'AMPK par l'adiponectine est dépendante du calcium. Le flux intracellulaire des ions  $Ca^{2+}$  active des kinases dépendantes du calcium telles que la CaMKK $\beta$  (calcium/calmodulin-dependant kinase kinase beta) qui activent la phosphorylation de la sous-unité  $\alpha$  de l'AMPK (**Figure 42**).



Figure 42. Importance du calcium lors de l'activation de l'AMPK par l'adiponectine.

L'adiponectine augmente la concentration intracellulaire de calcium *via* le relargage du RE ou l'influx des canaux membranaires. Le flux intracellulaire de calcium permet d'activer des kinases dépendantes des ions  $Ca^{2+}$  telle que la CaMKK $\beta$ , elle-même capable de phosphoryler et d'activer l'AMPK.

#### ✤ La voie de la PI3K

L'activation de la PI3K (phosphoinositide 3-kinase) est associée à un « **cross-talk** » entre les voies de signalisation de l'adiponectine et de l'insuline. En effet, suite à la liaison de l'adiponectine à ses récepteurs, la protéine adaptatrice APPL1 favorise la liaison des protéines IRS-1 et IRS-2 au récepteur de l'insuline (IR) *via* la formation d'un **complexe APPL1/IRS/IR** (Ryu *et al.*, 2014; Ruan and Dong, 2016). Les protéines IRS ainsi activées induisent la voie de la PI3K (**Figure 43**).

La **PI3K** est constituée de deux sous-unités (p110 et p85) formant un hétérodimère. La **sous-unité** catalytique p110 possède un domaine de liaison à la sous-unité régulatrice p85, un domaine de liaison aux phospholipides et un domaine kinase situé en région C-terminale. La **sous-unité régulatrice p85** agit comme un adaptateur qui se lie à la sous-unité p110 pour la guider vers la membrane plasmique. La PI3K induit alors la transformation du PIP<sub>2</sub> (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) en **PIP**<sub>3</sub> (phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate) qui devient un site d'ancrage pour de nombreuses protéines, telles que PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase-1) et **Akt**. PDK1 phosphoryle la protéine Akt qui est alors capable d'activer plus de 100 molécules impliquées dans des mécanismes cellulaires très variés tels que le **métabolisme énergétique**, l'**apoptose**, la **prolifération cellulaire**, l'**exocytose** et l'**autophagie** (Vanhaesebroeck *et al.*, 2012).



Figure 43. Mécanismes d'activation de la voie PI3K/Akt.

Modifié d'après Ruan et al. 2016. La protéine APPL1 induite par le signal adiponectine permet le recrutement et l'activation de IRS-1 et IRS-2. Les protéines IRS activent alors la PI3K et enfin la protéine Akt impliquée dans la régulation de nombreux processus cellulaires.

#### ✤ La voie de la PKA

Suite à la liaison à ses récepteurs, l'adiponectine stimule la formation d'AMP cyclique par l'adénylate cyclase activant la PKA (protéine kinase A) (Medina *et al.*, 2014). La liaison de l'AMP cyclique aux deux sous-unités régulatrices de la PKA induit la libération des deux sous-unités catalytiques capables de phosphoryler en particulier le facteur de transcription CREB. La PKA active également de nombreuses kinases telles que l'AMPK ou la protéine Akt (**Figure 44**). Elle contrôle ainsi le **cycle cellulaire** et l'**homéostasie énergétique**.



Figure 44. Mécanismes d'activation de la PKA.

L'adiponectine stimule la formation d'AMP cyclique par l'adenylate cyclase, induisant l'activation de la PKA et la dissociation des sous-unités régulatrices (R) et catalytiques (C). Ces dernières activent alors le facteur de transcription CREB. La PKA contrôle également directement la phosphorylation d'autres kinases telles que l'AMPK ou Akt.

#### ✤ <u>La voie des MAPK</u>

La voie de signalisation des MAPK est divisée en deux voies distinctes : la voie ERK et la **voie p38**. Il semblerait que l'adiponectine soit impliquée dans l'activation de cette dernière (Deepa and Dong, 2009; Ruan and Dong, 2016). En absence d'adiponectine, la protéine adaptatrice APPL1 forme un complexe inactif avec la protéine **TAK1** (transforming growth factor-β activated kinase 1). Suite à la liaison de l'adiponectine, le récepteur ADIPOR recrute la protéine APPL1 induisant ainsi la phosphorylation de la protéine TAK1, appartenant à la famille des MAPK kinases kinases (MKK kinases). La protéine TAK1 active par phosphorylation la protéine **MKK-3**, une MAPK kinase. MKK-3 active à son tour la **p38-MAPK** par phosphorylation (Xin *et al.*, 2011) (**Figure 45**). Cette MAPK régule l'activation de nombreux facteurs de transcription contrôlant l'expression de gènes impliqués dans la **réaction inflammatoire**, l'**apoptose**, la **prolifération** et la **différenciation cellulaires** (Ono and Han, 2000).





Modifié d'après Xin et al. 2010. Suite à la liaison de l'adiponectine, la protéine adaptatrice APPL1 liée à la MAPK kinase TAK1 se fixe au récepteur ADIPOR. Cela engendre le recrutement des protéines impliquées dans la voie de signalisation et la mise en place d'un complexe ADIPOR/APPL1/TAK1/MKK-3/p38. Suite à la cascade de phosphorylation, p38 est activée et le complexe se dissocie. p38 activée peut phosphoryler des facteurs de transcription impliqués dans le contrôle de nombreuses réponses cellulaires.

#### ✤ <u>La voie du facteur NF-кВ</u>

La voie du facteur NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B) est impliquée dans la régulation des mécanismes d'inflammation, d'apoptose et de nécrose. Il s'agit de la voie majoritairement activée par le TNF- $\alpha$ .

• 149 •

L'adiponectine inhibe l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B par blocage de la cascade de signalisation induite par la liaison du TNF- $\alpha$  à ses récepteurs TNFR1 ou TNFR2 (Ouchi and Walsh, 2007). Cette liaison ligand/récepteur entraîne le recrutement des protéines TRAF1 et TRAF2 (TNFR-associated factor) et du facteur NIK (NF- $\kappa$ B inducing kinase) qui induisent ainsi l'activation de la protéine **IKK** (I $\kappa$ B kinase). IKK phosphoryle ensuite le facteur I $\kappa$ B. Ce mécanisme entraîne la polyubiquitination et la dégradation de la protéine **I\kappaB**, libérant ainsi les facteurs de transcription p65 et p50 associés. L'hétérodimère p65/p50 forme le facteur **NF-\kappaB** qui subit alors une translocation nucléaire, régulant ainsi l'expression de gènes cibles impliqués dans la voie de l'inflammation (Israël, 2010) (**Figure 46**).

Il semble que les effets inhibiteurs de l'adiponectine sur la voie TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B soient dus à l'inhibition de la protéine IKK (Ouchi *et al.*, 2000) ou à l'inactivation directe des facteurs de transcription p65 et p50 (Salminen *et al.*, 2011). L'action de l'adiponectine sur l'expression de ce facteur de transcription semble être réalisée par le cross-talk entre la voie du TNF-  $\alpha$  et d'autres voies induites par l'adipokine (AMPK, PKA ou PI3K) (Ouchi and Walsh, 2007; Chen *et al.*, 2008).





A la suite de la liaison du TNF- $\alpha$  à son récepteur, une cascade de phosphorylation induit l'activation de la protéine IKK. Cette kinase phosphoryle I $\kappa$ B, entraînant la polyubiquitination et la dégradation de ce facteur, libérant ainsi les facteurs de transcription p50 et p65 formant l'hétérodimère NF-  $\kappa$ B. Ce facteur de transcription est transféré dans le noyau pour moduler l'expression de gènes de l'inflammation. L'adiponectine inhibe ces mécanismes par l'activation de kinases qui empêchent la phosphorylation de IKK ou inhibe l'activité transcriptionnelle de p50 et p65.

#### F. Adiponectine et homéostasie énergétique

L'adiponectine contrôle de nombreux paramètres du métabolisme énergétique en agissant sur les organes clés de l'homéostasie glucido-lipidique (le **foie**, le **muscle** et le **tissu adipeux**) où elle exerce une action **insulino-sensibilisatrice**.

#### 1. La production d'insuline

Chez la souris, l'injection d'adiponectine recombinante induit une augmentation des taux d'insuline circulants (Okamoto *et al.*, 2008). Ces résultats ont été confirmés *in vitro*. En effet, il a été démontré que le traitement de cellules  $\beta$  pancréatiques par l'adiponectine induit une augmentation de l'exocytose d'insuline, accompagnée d'une hausse d'expression des gènes *mafa* et *pdx-1*, des co-activateurs de la transcription du gène de l'insuline (Okamoto *et al.*, 2008; Wijesekara *et al.*, 2010).

#### 2. Le métabolisme glucidique

L'adiponectine favorise la **consommation** de glucose en stimulant la translocation membranaire du transporteur de glucose GLUT4 dans les cellules musculaires et les adipocytes suite à la phosphorylation de l'**AMPK** (Yamauchi *et al.*, 2002; Ceddia *et al.*, 2005; Saito *et al.*, 2007). Ce phénomène est associé à l'activation de la protéine Rab5 par la protéine APPL1. En effet, Rab5 est une GTPase impliquée dans la biogénèse des endosomes, dont le rôle semble crucial lors de la translocation de GLUT4 des endosomes vers la membrane plasmique (Mao *et al.*, 2006).

L'adiponectine inhibe également la formation de glucose et de glycogène. Dans les cellules hépatiques, la **néoglucogenèse** et la **glycogénolyse** sont freinées par l'adiponectine, suite à la diminution de l'expression de deux enzymes clés de ces voies, la glucose-6-phosphatase et la PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxy kinase) (Combs *et al.*, 2001; Yamauchi *et al.*, 2002). Dans les cellules musculaires, la production de **glycogène** est également diminuée par l'adiponectine, suite à l'activation de l'AMPK (Ceddia *et al.*, 2005). L'adiponectine induit ainsi une baisse de la glycémie. Par son **action hypoglycémiante**, l'adiponectine contribue à protéger l'organisme contre la survenue d'un diabète de type 2 (**Figure 48**).

#### 3. Le métabolisme lipidique

L'adiponectine augmente le **transport** des acides gras dans les cellules musculaires, en stimulant l'expression de l'acide-gras translocase (Karbowska and Kochan, 2006). Elle favorise également le catabolisme des acides gras en induisant l'activité et l'expression de nombreuses enzymes impliquées dans le processus de  $\beta$ -oxydation (Yamauchi *et al.*, 2002). En particulier *via* l'AMPK, l'adiponectine inactive par phosphorylation l'acetyl-coA carboxylase. Cette enzyme catalyse la production de malonyl-coA, un inhibiteur de la CPT-1 (carnitine palmitoyl transferase-1). Cette protéine assure le transport des acides gras vers la mitochondrie (Tomas *et al.*, 2002). En levant l'inhibition de la CPT-1, l'adiponectine favorise le **transport mitochondrial** des acides gras où ils sont dégradés par les enzymes de la  $\beta$ -oxydation. L'adiponectine régule également la transcription de nombreux gènes impliqués dans le **catabolisme** lipidique, tels que *ACO* (acyl-coA oxydase), *FABP3* (fatty-acid binding-protein 3) et *CPT-1 l* en induisant l'expression du facteur de transcription PPARa (Yoon *et al.*, 2006).

L'adiponectine favorise également l'accumulation des triglycérides dans les adipocytes (Fu *et al.*, 2005). Dans le foie en revanche, l'adiponectine réduit le transport des acides gras et l'accumulation de triglycérides (Yamauchi *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2012). En effet, l'adiponectine inhibe l'expression d'une trentaine de gènes hépatiques codant des protéines impliquées dans le transport des acides gras et dans la lipogenèse *de novo* (Liu *et al.*, 2012).

L'adiponectine contrôle donc le métabolisme lipidique en favorisant le transport des acides gras et la  $\beta$ oxydation dans les cellules musculaires, en inhibant la **lipogenèse hépatique** et en stimulant la **fonction de stockage par le tissu adipeux**. Elle induit donc la diminution des taux de lipides circulants, exerçant un **rôle hypolipémiant** dans l'organisme (**Figure 48**).

#### 4. La fonction mitochondriale

La **mitochondrie** constitue l'organite clé du métabolisme énergétique. Le catabolisme des glucides, des lipides et des protéines se termine dans la mitochondrie pour alimenter le **cycle de Krebs**. Il s'agit d'une suite de dix réactions enzymatiques qui conduit à (i) la formation de métabolites tels que le succinate, et (ii) la réduction de coenzymes tels que le NADH (nicotinamide adénine dinucléotide réduit). Ces

• 152 •

facteurs intègrent ensuite la **chaine respiratoire**, formée de quatre complexes protéiques (I, II, III, IV) situés dans la membrane mitochondriale interne. Suite à une cascade de réactions d'oxydo-réduction, associée à un transfert d'électrons et à un gradient de protons H<sup>+</sup>, l'ATP est produit par l'**ATP synthase** (**Figure 47**).



Figure 47. Activation de la chaine respiratoire mitochondriale et synthèse d'ATP.

La synthèse d'ATP est donc étroitement liée au stock de mitochondries fonctionnelles dans la cellule. La **biogénèse mitochondriale** est ainsi régulée par de nombreux mécanismes cellulaires et dépend notamment du statut énergétique de la cellule (Jornayvaz and Shulman, 2010). Dans les cellules musculaires, l'adiponectine stimule la biogénèse mitochondriale par l'activation de l'AMPK qui induit l'expression des facteurs de transcription SIRT1 (sirtuin 1) et PGC1- $\alpha$  (PPAR $\gamma$  coactivator 1-alpha) (Iwabu *et al.*, 2010; Qiao *et al.*, 2012). PGC1- $\alpha$  est considéré comme le régulateur clé de la biogénèse mitochondriale. Il induit l'expression des gènes *ERR* (estrogen-related receptor) et *NRF* (nuclear respiratory factor) qui activent la transcription du génome mitochondrial (Jornayvaz and Shulman, 2010).



#### Figure 48. Régulation de l'homéostasie glucido-lipidique par l'adiponectine.

L'adiponectine exerce une action insulino-sensibilisatrice dans l'organisme, notamment en stimulant la production d'insuline par le pancréas. Elle active ensuite le transport et le cataolisme des lipides et des glucides dans le muscle, *via* la voie de l'AMPK. Elle inhibe en parallèle toutes les voies anaboliques dans le foie et le muscle. Enfin, elle favorise les capacités de stockage des lipides par le tissu adipeux. L'adiponectine est donc qualifiée d'hormone hypoglycémiante et hypolipémiante.

#### 5. Les récepteurs ADIPOR : de potentielles cibles thérapeutiques

Il semblerait que l'adiponectine exerce des **effets protecteurs et bénéfiques** à l'organisme, en participant notamment à la mise en place d'un environnement favorable au maintien de l'homéostasie glucido-lipidique et en limitant la survenue de pathologies telles que le diabète de type 2, l'athérosclérose et les maladies cardio-vasculaires. Ainsi, les effets anti-diabétiques de l'adiponectine ont conduit les scientifiques à rechercher des molécules pouvant mimer les effets de cette adipokine. La molécule **AdipoRon** a été testée *in vitro* sur des cellules musculaires. Il a été observé que cet agoniste des ADIPOR est capable de se lier aux deux isoformes ADIPOR1 et ADIPOR2, et d'activer la voie de l'AMPK et du facteur de transcription PPARa. AdipoRon stimule également la biogénèse mitochondriale *via* l'expression de PGC1- $\alpha$  (Okada-Iwabu *et al.*, 2013). Ces résultats prometteurs ont été confirmés chez la souris, après l'administration orale de cet agoniste. En effet, AdipoRon réduit la résistance à l'insuline, l'intolérance au glucose et les dyslipidémies contribuant à augmenter l'espérance de vie des animaux (Okada-Iwabu *et al.*, 2013).

#### G. Adiponectine et cycle cellulaire

L'obésité est à l'origine de nombreux désordres métaboliques mais constitue également un facteur de risque accru de survenue de nombreux **cancers**. Une méta-analyse a ainsi démontré que 11 cancers sont corrélés à l'obésité. Les organes touchés sont l'œsophage, l'estomac, le colon, le rectum, le foie, le pancréas, le sein, l'endomètre, l'ovaire, le rein et la moelle osseuse (Basen-Engquist and Chang, 2011). De faibles taux d'adiponectine circulants, caractéristiques de l'obésité, semblent être associés à la survenue des cancers de la prostate, de l'endomètre, du sein, des ovaires, de l'œsophage, du colon et du pancréas (Izadi *et al.*, 2012). L'implication de l'adiponectine dans ce processus pathologique serait liée à son rôle dans la régulation des mécanismes de **prolifération**, **différenciation** et **mort cellulaires** *via* les voies MAPK, PI3K/Akt, AMPK et PKA.

#### 1. La balance prolifération / apoptose

L'adiponectine est considérée comme une **hormone pro-apoptotique** dans de nombreux types cellulaires (cellules cancéreuses mammaires, cellules endothéliales, cellules musculaires...). En effet, l'adiponectine est capable de contrôler la balance d'expression des gènes anti-apoptotiques tels que *BCL-2* (B-cell lymphoma-2) et des gènes pro-apoptotiques tels que *TP53* (tumor protein 53 kDa) et *BAX* (BCL-2-associated X protein) (Brakenhielm *et al.*, 2004; Dieudonne *et al.*, 2006; Konishi *et al.*, 2011).

Il a également été démontré *in vitro* que l'adiponectine **régule négativement la prolifération cellulaire**, notamment dans le contexte du cancer. Ainsi, elle inhibe par exemple la prolifération des cellules cancéreuses pulmonaires (Illiano *et al.*, 2017), cérébrales (Porcile *et al.*, 2014) ou encore endométriales (Moon *et al.*, 2011). L'adiponectine inhibe également la prolifération des cellules saines, telles que les cellules musculaires lisses (Fuerst *et al.*, 2012), hépatiques (Adachi and Brenner, 2008) ou les cellules progénitrices de la lignée myéloïde (Yokota *et al.*, 2000). Ces effets anti-prolifératifs sont associés à un arrêt du cycle cellulaire, en particulier par inhibition de l'expression de la cycline D1. Les voies de signalisation impliquées sont quant à elles diverses. En effet, les effets anti-prolifératifs de l'adiponectine semblent emprunter la voie ERK, la voie AMPK et la voie PI3K (Dieudonne *et al.*, 2006; Adachi and Brenner, 2008; Fuerst *et al.*, 2012).

Outre ses effets anti-prolifératifs et pro-apoptotiques, l'adiponectine exerce son effet anti-tumoral en limitant l'agressivité des cellules cancéreuses, notamment par l'inhibition des mécanismes d'**adhésion**, d'**invasion** et de **migration** cellulaires. Ces effets ont notamment été décrits dans le cas du cancer du sein. L'adiponectine induit l'activation de l'AMPK qui phosphoryle le complexe TSC (tuberous sclerosis complex) et inhibe ainsi la voie mTOR (mammalian target of rapamycin). Cette cascade de signalisation entraîne une inhibition de la phosphorylation de la kinase p7086 (S6K) et par la suite une réduction des phénomènes de migration et d'invasion cellulaires (Saxena and Sharma, 2010). Ce rôle **anti-métastatique** de l'adiponectine a également été décrit dans les cellules cancéreuses hépatiques et intestinales (Karrasch *et al.*, 2009; Ramezani-Moghadam *et al.*, 2015). L'utilisation thérapeutique de molécules antagonistes de l'adiponectine constitue donc un intérêt médical majeur dans le traitement de cancers. Ainsi, plusieurs antagonistes des récepteurs ADIPOR1et ADIPOR2 ont été testés et semblent avoir des propriétés anti-cancéreuses *in vitro*. C'est notamment le cas du deoxyschizandrine, de la syringine, du taxifoliol, du parthenolide et de la gramine (Sun *et al.*, 2013).

#### 2. La différenciation cellulaire

L'adiponectine induit la différenciation de nombreux types cellulaires. Cet effet a notamment été décrit dans les adipocytes, où elle exerce un effet autocrine positif au cours de l'adipogenèse (Fu *et al.*, 2005). Elle présente également une **action pro-différenciante** dans les ostéoblastes, les kératinocytes, les cellules musculaires squelettiques et les cellules endothéliales. Au cours de ce processus, les voies de signalisation empruntées par l'adiponectine sont diverses. Ainsi, ces effets pro-différenciants sont réalisés par la voie PI3K, la voie MAPK et celle de l'AMPK. (Kawai *et al.*, 2008; Fiaschi *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009; Ding *et al.*, 2011).

#### H. Adiponectine et immunité / inflammation

L'adiponectine exerce des effets **anti-inflammatoires** en inactivant la voie du facteur NF- $\kappa$ B. Plus précisément, elle inhibe *in vitro* les capacités de phagocytose des macrophages matures. Ces effets sont réalisés par l'intermédiaire du récepteur du complément C1q nommé C1qRp. Une diminution de la

• 156 •

production de TNF- $\alpha$  par ces macrophages est également observée en présence d'adiponectine (Yokota *et al.*, 2000).

L'adiponectine régule directement la production de cytokines inflammatoires *via* l'augmentation de l'expression du facteur de transcription PPAR $\gamma_2$  qui inhibe l'activité transcriptionnelle du NF- $\kappa$ B. Elle induit ainsi une diminution de la production des interleukines pro-inflammatoires IL-6 et IL-1 $\beta$ , du TNF- $\alpha$  et de la protéine C réactive (Ouchi *et al.*, 2003; Wulster-Radcliffe *et al.*, 2004; Ajuwon and Spurlock, 2005). Enfin, l'activation de la voie MAPK et de la voie PKA par l'adiponectine stimule la production de l'interleukine anti-inflammatoire IL-10, suite à la phosphorylation du facteur de transcription CREB (Wolf *et al.*, 2004; Villarreal-Molina and Antuna-Puente, 2012).

Par cette action anti-inflammatoire, l'adiponectine semble exercer des effets protecteurs contre la survenue de l'**athérosclérose** et des maladies cardiovasculaires associées. En effet, l'administration d'adiponectine chez la souris réduit la gravité des lésions athéromateuses. Ces effets sont accompagnés d'une réduction de l'expression des molécules d'**adhésion** à la surface des cellules endothéliales, telle que VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) et à la surface des macrophages, tel que SR-A (scavenger receptor A) (Okamoto *et al.*, 2002). Ainsi, l'adiponectine réduit l'adhésion des macrophages aux parois artérielles. Par son effet hypolipémiant, l'adiponectine contribue à limiter l'arrivée des lipoprotéines (LDL) sur le site lésé. Elle inhibe également l'**oxydation** de ces LDL, en diminuant le stress oxydatif dans l'endothélium. Ainsi, l'adiponectine limite l'accumulation de LDL oxydées dans les macrophages, inhibant la formation des cellules spumeuses (Li *et al.*, 2007). Enfin, elle limite la prolifération des cellules musculaires lisses et l'**épaississement** de la plaque d'athérome (Barseghian *et al.*, 2011).

L'adiponectine semble également jouer un rôle protecteur dans la survenue de **pathologies dégénératives** liées à l'inflammation, comme la maladie d'Alzheimer (Ng and Chan, 2017), la dégénérescence du cartilage articulaire (Lago *et al.*, 2008) ou encore la dégénérescence maculaire (Kaarniranta *et al.*, 2012).

#### I. Adiponectine et fonction de reproduction

L'obésité est associée à de nombreux défauts de la fonction de reproduction chez de nombreuses espèces animales, incluant l'espèce humaine. Chez la femme, les effets néfastes de l'obésité interviennent dès l'adolescence. Il a été démontré que le risque de **puberté précoce** est plus élevé chez la fille obèse. Cette puberté précoce augmente l'incidence de certains cancers (Stoll, 1998), la formation de kystes ovariens (Pienkowski *et al.*, 2012) et la mise en place d'un hyperandrogénisme (Lazar *et al.*, 2014). L'obésité entraîne également une **baisse de la fertilité**. En effet, les femmes obèses présentent une diminution des chances de grossesse spontanée et une augmentation du délai de conception (van der Steeg *et al.*, 2007; Wise *et al.*, 2010). De plus, lors de leur prise en charge en assistance médicale à la procréation, le taux de succès de ces techniques est plus faible au sein de cette population (Vural *et al.*, 2015). L'obésité altère les processus physiologiques de nombreux organes impliqués dans la fonction reproductrice (Bry and Young, 2012). Dans ce contexte, il est probable que le déficit en adiponectine observé chez les individus obèses participe à l'hypofertilité de cette population. De nombreux travaux se sont attachés à démontrer le rôle direct de l'adiponectine sur les fonctions de reproduction.

#### 1. Apport des modèles animaux

Une lignée de souris dont le gène codant l'adiponectine a été invalidé (**modèle Adipo** -/-) a été utilisée pour l'étude des mécanismes impliqués dans les désordres métaboliques associés à l'obésité (Combs *et al.*, 2004; Nawrocki *et al.*, 2005; Asano *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2015). Longtemps, la fertilité de ces souris a été considérée comme normale et ce modèle n'a donc pas été utilisé pour étudier le rôle de l'adiponectine sur la reproduction (Maeda *et al.*, 2002). Cependant, une étude récente a montré que ces souris Adipo -/- présentent des anomalies de l'axe hypothalamo-hypophysaire, des fonctions ovariennes et de la descendance (Cheng *et al.*, 2016) (**Tableau 11**).

Un second modèle murin a été mis au point afin d'étudier les effets d'une augmentation des taux d'adiponectine circulants sur la santé des animaux (**lignée**  $\Delta$ Gly-adiponectine). Ainsi, suite à une mutation du domaine protéique collagène (délétion de 13 répétitions du motif Gly-X-Y), une augmentation d'un facteur 3 de l'adiponectinémie est observée (Combs *et al.*, 2004). Cependant, alors

• 158 •

que les mâles sont fertiles, les femelles sont totalement stériles. Les mécanismes impliqués dans ce phénomène n'ont en revanche jamais été étudiés à ce jour (Combs *et al.*, 2004; Kawwass *et al.*, 2015).

AXE HYPOTHALAMO- HYPOPHYSAIRE	<ul> <li>Diminution de la sécrétion de FSH</li> <li>Augmentation de la sécrétion de LH</li> <li>Diminution du pic de LH en réponse aux œstrogènes</li> <li>Diminution du nombre de neurones à GnRH</li> </ul>			
OVAIRE	<ul> <li>Diminution du nombre d'ovocytes ovulés</li> <li>Diminution du nombre d'ovocytes pré-antraux et antraux</li> <li>Augmentation du nombre d'ovocytes atrétiques</li> <li>Diminution de la sécrétion d'œstrogènes et de progestérone</li> <li>Dérégulation du cycle œstral</li> <li>Augmentation de la durée du diœstrus (repos sexuel)</li> </ul>			
DESCENDANCE	<ul> <li>Diminution du taux de natalité</li> <li>Diminution du nombre de petits par portée</li> </ul>			

Tableau 11. Hypofertilité de la souris (Adipo -/-) femelle.

#### 2. Adiponectine et axe hypothalamo-hypophysaire

L'adiponectine et ses récepteurs ADIPOR1 et ADIPOR2 sont exprimés dans l'hypothalamus et l'hypophyse humains (Kos *et al.*, 2007; Psilopanagioti *et al.*, 2009). L'adiponectine est également présente dans le liquide céphalo-rachidien, suggérant une action autocrine ou paracrine de cette adipokine sur l'axe hypothalamo-hypophysaire (Kos *et al.*, 2007). Des études *in vitro* ont notamment décrit un effet inhibiteur de l'adiponectine sur la sécrétion de **GnRH** par les cellules hypothalamiques *via* l'activation de l'AMPK (Cheng *et al.*, 2011). Dans l'hypophyse, elle diminue la sécrétion de **LH** et l'expression du gène codant le récepteur à la GnRH (GnRH-R) (Rodriguez-Pacheco *et al.*, 2007). L'ensemble de ces effets de l'adiponectine est associé à la réduction de l'expression du gène *KISS1* codant les **kisspeptines** dans l'hypothalamus (Wen *et al.*, 2012). Les kisspeptines sont des neuropeptides hypothalamiques découvert au cours des années 2000. La liaison des kisspeptines à leur récepteurs KISS1-R semble être le mécanisme déclenchant la puberté en induisant la sécrétion de GnRH. Ainsi, l'adiponectine semble diminuer la sécrétion des hormones GnRH et LH par l'axe hypothalamo-hypophysaire, *via* la réduction du signal émis par les kisspeptines.

#### 3. Adiponectine et ovaire

L'adiponectine et ses deux récepteurs ont été détectés dans les cellules de la thèque et du corps jaune, dans le liquide folliculaire et dans l'ovocyte chez de nombreuses espèces (Ledoux et al., 2006; Chabrolle et al., 2007a, 2009; Bersinger and Wunder, 2010). Dans plusieurs modèles dont l'espèce humaine, l'adiponectine augmente l'expression d'enzymes assurant la synthèse d'œstradiol et de progestérone par les cellules de la granulosa (Chabrolle et al., 2007b, 2009; Maillard et al., 2010; Richards et al., 2012). Chez la vache cependant, l'adiponectine exerce des effets négatifs sur la stéroïdogénèse (Lagaly et al., 2008). Dans ce modèle, elle ne semble pas modifier la maturation ovocytaire ni le développement embryonnaire (étudiés respectivement par le pourcentage d'ovocytes entrant en métaphase II et par le nombre d'embryons qui atteignent le stade blastocyste le huitième jour post-fécondation) (Maillard et al., 2010). Dans le modèle porcin, l'adiponectine stimule le développement embryonnaire (Chappaz et al., 2008). Chez la femme et la souris, l'adiponectine améliore in vitro la maturation ovocytaire, les taux de fécondation et le clivage embryonnaire, augmentant le nombre d'embryons atteignant le stade blastocyste (Richards et al., 2012). L'adiponectine est ainsi considérée comme un marqueur prédictif du succès des techniques d'assistance médicale à la procréation. En effet, les taux d'adiponectine sont plus faibles dans les liquides folliculaires issus de femmes souffrant d'échecs répétés d'implantation (Bersinger et al., 2006).

L'adiponectine inhibe également la synthèse d'androgènes et notamment d'androstènedione dans l'ovaire murin (Comim *et al.*, 2016). Chez les femmes souffrant du **syndrome des ovaires polykystiques**, caractérisé par un hyperandrogénisme, les taux circulants d'adiponectine sont diminués (Sepilian and Nagamani, 2005). De plus, la mutation silencieuse 45 (G-T) au sein de l'exon 2 du gène *apM1*semble être impliquée dans la prédisposition à ce syndrome. Notamment, la fréquence de l'allèle T est surreprésentée dans la population de femmes atteintes de ce syndrome (Ranjzad *et al.*, 2012; Mahdi *et al.*, 2016).

#### 4. Adiponectine et endomètre

Le rôle de l'adiponectine dans l'endomètre est relativement peu connu. Les récepteurs ADIPOR1, ADIPOR2 et l'adiponectine elle-même sont présents dans ce tissu (Takemura *et al.*, 2006; Dos Santos *et al.*, 2012). Une variation de l'expression des protéines ADIPOR1 et ADIPOR2 a été mesurée au cours du cycle menstruel. Plus précisément, cette expression est maximale au milieu de la phase sécrétoire du cycle, correspondant à la période de **réceptivité utérine à l'embryon** (Takemura *et al.*, 2006). Cette étude suggère donc un rôle important du signal adiponectine au cours de l'implantation embryonnaire. Cette hypothèse a été renforcée par une étude récente qui démontre que les endomètres de femmes souffrant d'échecs répétés d'implantation sous-expriment ADIPOR1 et ADIPOR2, comparativement aux endomètres de femmes fertiles (Dos Santos *et al.*, 2012). L'adiponectine exercerait également un effet anti-inflammatoire dans l'endomètre, en inhibant la production de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-6, IL-8 et MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) (Takemura *et al.*, 2006). Enfin, l'adiponectine diminue *in vitro* la viabilité cellulaire des cellules endométriales stromales humaines (Bohlouli *et al.*, 2013).

Plusieurs travaux ont mis en évidence que de faibles taux d'adiponectine circulante constituent un facteur de risque dans la survenue de cancers gynécologiques (sein, endomètre, ovaire) (Izadi *et al.*, 2012). Le lien entre l'adiponectine et l'**endométriose** a ainsi été étudié. Cette pathologie correspond à une implantation ectopique et à un fort pouvoir invasif du tissu endométrial. Il a ainsi été observé que les taux d'adiponectine circulants sont plus faibles chez les femmes souffrant de cette pathologie (Takemura *et al.*, 2005). Il apparaît donc que l'adiponectine est un facteur protecteur vis-à-vis de la survenue de l'endométriose.

#### J. Adiponectine et grossesse

#### 1. Cinétique de l'adiponectinémie maternelle

Après plusieurs controverses, il est aujourd'hui bien établi que l'adiponectine ne constitue pas une hormone placentaire. En effet, aucun type cellulaire du placenta ne sécrète l'adiponectine (Benaitreau

• 161 •

*et al.*, 2010a, 2010b). Ainsi, l'adiponectinémie maternelle est constante tout au long de la gestation et résulte principalement de la production adipocytaire. Cependant, une diminution des taux d'adiponectine circulants est observée après l'accouchement (Mazaki-Tovi *et al.*, 2007). Cela suggère que les facteurs placentaires contribuent à l'augmentation de l'adiponectinémie dès le début de la grossesse et que cela perdure jusqu'à la parturition. Il a également été démontré que la forme HMW de l'adiponectine est surreprésentée dans la circulation sanguine de la femme enceinte comparativement à la femme non-enceinte (Mazaki-Tovi *et al.*, 2008).

#### 2. Adiponectine et placenta

L'adiponectine semble exercer une action endocrine (*via* le tissu adipeux) ou paracrine (*via* l'endomètre) dans le placenta. Elle contrôle ainsi de nombreux processus placentaires.

- **Réponse inflammatoire**. De manière intéressante, alors que son rôle anti-inflammatoire a été décrit dans de nombreux organes, y compris dans l'endomètre, il semble que l'adiponectine exerce un effet pro-inflammatoire dans le placenta de troisième trimestre. L'adiponectine induit notamment la production des molécules inflammatoires CD24 et Siglec-10 et des interleukines IL-8 et IL-1β par les trophoblastes issus de placentas à terme (McDonald and Wolfe, 2011). Ces effets pro-inflammatoires ont été également observés lors de la culture *in vitro* d'explants placentaires de troisième trimestre, en présence d'adiponectine. Les auteurs observent une augmentation de la sécrétion des interleukines IL-6 et IL-1β et du TNF-α *via* la voie du NF-κB (Lappas *et al.*, 2005). Ces facteurs pourraient se révéler nécessaires pour déclencher le phénomène d'immunotolérance chez la mère.
- Prolifération cellulaire. L'adiponectine exerce son rôle « classique » d'hormone anti-proliférative dans les cellules trophoblastiques villeuses de premier trimestre (Benaitreau *et al.*, 2009). Ces résultats sont également observés dans le placenta à terme, où l'adiponectine réduit le nombre de cellules entrant en mitose par un contrôle de la voie MAPK (Chen *et al.*, 2014).
- Différenciation cellulaire. L'adiponectine stimule la différenciation biochimique (sécrétion d'hCG et de leptine) et morphologique (augmentation de l'expression de la syncytine-2 et diminution de

• 162 •

l'expression de l'E-cadhérine) des trophoblastes villeux de premier trimestre dits « précoces » (obtenus avant l'arrivée du sang maternel dans la chambre intervilleuse) (Benaitreau *et al.*, 2010b). En revanche, elle inhibe la différenciation biochimique des cellules trophoblastiques villeuses issues de placentas de premier trimestre « tardifs » et de placentas de troisième trimestre (McDonald and Wolfe, 2009; Benaitreau *et al.*, 2010b). Elle n'a cependant aucun effet sur la différenciation morphologique dans le placenta à terme (McDonald and Wolfe, 2009).

- Invasion cellulaire. L'adiponectine augmente les capacités invasives des cellules trophoblastiques extravilleuses en stimulant l'activité des métalloprotéases MMP-2 et MMP-9, deux enzymes majeures du processus d'invasion, qui digèrent la matrice extracellulaire de l'endomètre. Ces enzymes favorisent ainsi la migration des cellules trophoblastiques au sein de la décidue. Parallèlement, l'adiponectine diminue l'expression de l'inhibiteur des métalloprotéases, TIMP-2 (Benaitreau *et al.*, 2010a).
- Croissance fœtale. Il a été observé dans un modèle murin que l'injection d'adiponectine chez la mère induit une réduction de la croissance fœtale des souriceaux (Rosario *et al.*, 2012). Chez l'espèce humaine, une corrélation négative entre l'adiponectinémie maternelle et le poids des nourrissons a également été observée (Aye *et al.*, 2013). Cet effet de l'adiponectine sur la croissance fœtale peut être relié aux effets de cette adipokine sur l'expression des transporteurs de nutriments dans le placenta. En effet, l'adiponectine inhibe l'expression des transporteurs des acides-aminés (SNAT) dans le placenta humain à terme (Jones *et al.*, 2010). De la même façon chez la ratte gestante, l'adiponectine réduit l'expression du transporteur de glucose GLUT3 et celle de la lipoprotéine lipase transportant les acides gras dans le placenta (Caminos *et al.*, 2005). Des résultats similaires ont été observés chez la souris. En effet, l'administration chronique d'adiponectine au cours de la gestation réduit le transport placentaire des acides aminés chez cette espèce (Rosario *et al.*, 2012). Ainsi, en inhibant le transport des nutriments, l'adiponectine semble réguler négativement la croissance fœtale.

#### 3. Adiponectine et pathologies de la grossesse

#### \* Adiponectinémie maternelle

Le **diabète gestationnel** est clairement associé à une hypoadiponectinémie (Atègbo *et al.*, 2006; Jo and Im, 2008; Lain *et al.*, 2008; Horosz *et al.*, 2011; Pala *et al.*, 2015).

En revanche, les données concernant le lien entre les taux d'adiponectine circulante et le **retard de croissance** *in utero* sont contradictoires. Certaines études observent une corrélation négative entre les taux d'adiponectine maternelle et la survenue de cette pathologie (Kyriakakou *et al.*, 2008; Visentin *et al.*, 2014). D'autres données démontrent que l'adiponectinémie maternelle est augmentée dans le cas du retard de croissance intra-utérin (Evagelidou *et al.*, 2007; Büke *et al.*, 2014).

Concernant la **pré-éclampsie**, certaines études observent une augmentation des taux d'adiponectine maternelle (Nien *et al.*, 2007; Fasshauer *et al.*, 2008; Khosrowbeygi and Ahmadvand, 2009; Abd-Alaleem *et al.*, 2011) alors que d'autres reportent une diminution de l'adiponectinémie (Takemura *et al.*, 2005; Suwaki *et al.*, 2006; Ouyang *et al.*, 2007). Enfin, certaines équipes n'observent aucun lien entre l'adiponectine maternelle circulante et cette pathologie (Mazaki-Tovi *et al.*, 2009c; Dalamaga *et al.*, 2011). Ces résultats pourraient s'expliquer par la grande hétérogénéité étiologique des femmes pré-éclamptiques.

#### Polymorphismes génétiques du gène apM1 maternel

De nombreuses mutations ponctuelles (SNP) au sein de la séquence du gène *apM1* ont été recensées. Parmi elles, les mutations 45 (T-G) et 276 (G-T) sont les plus étudiées. Il a notamment été observé qu'une variation de la fréquence de ces polymorphismes est un facteur de prédisposition à l'obésité, à l'insulino-résistance, au diabète de type 2, aux maladies cardiovasculaires et au syndrome métabolique (Bacci *et al.*, 2004; Biswas *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011; Yuan *et al.*, 2016).

Comme décrit précédemment, le polymorphisme 45 (G-T) est associé au syndrome des ovaires polykystiques. Il semble également être impliqué lors de la survenue du **diabète gestationnel**. Ainsi, la présence de l'allèle G chez la femme (haplotype GG ou GT) est associée à une réduction de l'adiponectinémie et au développement d'un diabète gestationnel (Han *et al.*, 2015) (**Tableau 12**).

• 164 •

La mutation 276 (G-T) semble être associée à la **pré-éclampsie**. Plus précisément, la présence de l'allèle T protégerait les femmes de la survenue de cette pathologie ou limiterait sa gravité (Saarela *et al.*, 2006; Youpeng *et al.*, 2010). Le polymorphisme -11377 (C-G) déjà identifié comme étant associé l'hypertension (Ong *et al.*, 2010) semble lui aussi impliqué. L'allèle G prédispose les individus à la pré-éclampsie (Machado *et al.*, 2014) (**Tableau 12**).

Tablaan 11	) I 'adi	nonactina	ot los	nothologias	do lo	ronroduction
Tableau 14	L au	ponecune	eties	pathologies	ue la	reproduction.

	Adiponectinémie	Polymorphismes génétiques
Syndrome des ovaires polykystiques	Ц	45 (G- <b>T</b> )
Endométriose	R	données inconnues
Pré-éclampsie	données controversées	-11377 (C-G) et 276 (G-T)
Diabète gestationnel	Ц	45 ( <b>G</b> -T)

# PARTIE 2 DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE

#### Présentation du laboratoire

Ces travaux de thèse ont été réalisés au sein de l'équipe d'accueil (EA) 7404 - Gamètes Implantation Gestation (GIG) dirigée par le Professeur François Vialard. Ce laboratoire est situé au sein de l'Unité de Formation et de Recherche (UFR) des Sciences de la Santé de l'Université de Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines, membre de l'Université Paris-Saclay. L'équipe se compose d'universitaires et de personnels hospitalo-universitaires. Les travaux du laboratoire s'effectuent en étroite collaboration avec le Centre Hospitalier Intercommunal (CHI) de Poissy-Saint-Germain-en-Laye et l'Hôpital Foch de Suresnes. Suite à son rapprochement avec l'unité mixte de recherche (UMR) 1198, dirigée par le Docteur Corinne Cotinot et située dans le centre de l'INRA de Jouy-en-Josas, l'EA-7404 deviendra une équipe mixte de recherche (EMR) au cours de l'année 2017. L'UMR-1198 est une équipe spécialisée dans l'étude de la biologie de la reproduction et du développement chez des modèles animaux (bovins, caprins, ovins, porcins, murins, équins...).

Les activités de recherche de l'EA-7404 s'organisent selon trois thématiques distinctes, dont l'objectif principal est d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans les problèmes de fertilité et dans la survenue de pathologies de la grossesse. Dans ce contexte, l'équipe « **Gamètes** » étudie l'étiologie ainsi que les potentielles prédispositions génétiques et/ou épigénétiques à l'infertilité humaine. L'étude des anomalies de la morphologie du spermatozoïde (présence de vacuoles, par exemple) ont été plus particulièrement étudiés, ainsi que les mécanismes génétiques et moléculaires impliqués dans ce phénomène. Des expérimentations sont également en cours afin d'étudier les mécanismes de la folliculogénèse *in vitro*. L'équipe « **Implantation** » s'intéresse quant à elle aux phases d'implantation embryonnaire et de placentation. Ce groupe de travail étudie notamment le développement du placenta humain, ainsi que les phénomènes de différenciation et de réceptivité endomètriales. L'objectif est de comprendre les interactions mises en place entre le fœtus et l'endomètre au cours de la grossesse saine et pathologique (retard de croissance intra-utérin, pré-éclampsie, fausses-couches spontanées à répétition et échecs répétés d'implantation). Enfin, l'équipe « **Gestation** » s'intéresse à la mise au point d'un outil diagnostic visant à détecter les pathologies fœtales (comme la trisomie 21, par exemple). L'installation récente d'une plateforme de perfusion placentaire au sein du laboratoire permet également

d'étudier le passage transplacentaire de molécules (comme les nutriments ou les xénobiotiques) entre le compartiment maternel et le compartiment fœtal. Enfin, l'impact du microbiote utérin et placentaire sur le déroulement de la grossesse est également étudié.

#### Contexte de recherche

L'ensemble des expérimentations effectuées au cours de cette thèse a été réalisé au sein de l'équipe « **Implantation** » de l'EA-7404. Cette équipe s'intéresse particulièrement aux rôles du facteur préimplantatoire (**PIF**) et de deux adipokines (la **leptine** et l'**adiponectine**) au cours de la placentation. Ce projet de thèse a été rédigé en 2014, suite à la publication de nombreux résultats relatifs aux rôles de l'adiponectine à l'interface fœto-maternelle. Il s'intitule « Rôles de l'adiponectine à l'interface fœtomaternelle humaine au cours du premier trimestre de grossesse ».

Seules trois études concernant le rôle de l'adiponectine dans l'**endomètre humain** ont été réalisées. La première montre que l'expression endométriale de l'adiponectine et de ses deux récepteurs spécifiques (ADIPOR1 et ADIPOR2) varie au cours du cycle menstruel. Plus précisément, les auteurs démontrent que l'expression de ADIPOR1 et ADIPOR2 est maximale au milieu de la phase sécrétoire, considérée comme la phase de réceptivité utérine (Takemura *et al.*, 2006). L'importance du signal adiponectine a été confirmée par les travaux du laboratoire qui ont démontré que les endomètres de femmes infertiles (souffrant d'échecs répétés d'implantation) sous-expriment ADIPOR1 et ADIPOR2 comparativement aux endomètres issus de femmes fertiles (Dos Santos *et al.*, 2012). Cependant, une seule étude s'est attachée à étudier les effets directs *in vitro* de l'adiponectine sur les cellules endométriales. Ainsi, il a été démontré que les cellules stromales endométriales (CSE) isolées expriment ADIPOR1 et ADIPOR2 et que l'adiponectine diminue la viabilité des CSE *in vitro* (Bohlouli *et al.*, 2013).

Concernant le **placenta**, les données sont beaucoup plus fournies. Des travaux réalisés au sein du laboratoire ont permis de démontrer que l'adiponectine à la différence de la leptine n'est pas sécrétée par le placenta humain (Benaitreau et al. 2009; Benaitreau et al. 2010a). En revanche, il semble que cette adipokine participe activement à la mise en place d'un placenta fonctionnel, en augmentant les capacités sécrétoires et d'ancrage du placenta à l'endomètre. En effet des études *in vitro* réalisées par l'EA-7404

ont démontré que l'adiponectine favorise l'invasion trophoblastique des cytotrophoblastes extravilleux (CTEV) (Benaitreau et al. 2010a). Elle induit également la différenciation morphologique et biochimique des cytotrophoblastes villeux (CTV) en syncytiotrophoblaste (ST) (Benaitreau et al. 2010b).

En outre, il a été démontré que l'adiponectine maternelle pourrait exercer un contrôle négatif sur la **croissance fœtale**. En effet, les taux d'adiponectine circulante chez la mère sont inversement proportionnels au poids fœtal (Aye *et al.*, 2013). De plus, il a été démontré dans un modèle murin, que l'injection chronique d'adiponectine induit une diminution de la croissance fœtale associée à une réduction de l'expression des transporteurs d'acides aminés (SNAT1,2,4 et LAT1,2) dans le placenta (Rosario *et al.*, 2012). De même chez la ratte gestante, l'injection d'adiponectine diminue l'expression du transporteur de glucose GLUT3 et de la lipoprotéine lipase, impliquée dans le transport des lipides (Aye *et al.*, 2014). Ces résultats ont été confirmés chez l'espèce humaine. En effet, l'adiponectine *in vitro* diminue l'expression des transporteurs d'acides aminés dans les CTV issus de placenta de troisième trimestre (Jones *et al.*, 2010).

#### Objectifs du travail de thèse

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail a été d'étudier le rôle de l'adiponectine à l'interface fœtomaternelle humaine au cours du **premier trimestre de grossesse**. Cette période est considérée comme cruciale, car toutes les grossesses pathologiques entraînant des anomalies fœtales ou des complications maternelles, trouvent leur origine au premier trimestre de grossesse, notamment lors des phases d'implantation embryonnaire et de placentation.

Le **premier objectif** de ces travaux de thèse a consisté à étudier le rôle de l'adiponectine sur la préparation de l'endomètre à une éventuelle grossesse. Nous nous sommes donc intéressés à l'action de cette cytokine au cours de la différenciation des CSE en cellules déciduales (processus de décidualisation). Nous avons également étudié l'influence de l'adiponectine sur le contrôle de l'invasion trophoblastique exercé par les cellules déciduales. En outre, nous avons réalisé une étude chez une population de femmes souffrant de fausses-couches spontanées à répétition, afin d'étudier le potentiel

• 169 •

lien entre l'adiponectine et la survenue de cette pathologie, qui est associée à un défaut d'invasion trophoblastique.

Dans un **second temps**, nous nous sommes focalisés sur le rôle de l'adiponectine dans le contrôle de la nutrition histiotrophe au cours du premier trimestre de grossesse. Plus précisément, nous nous sommes intéressés aux rôles de l'adiponectine sur le métabolisme glucidique dans les CSE au cours de la décidualisation. Nous avons également étudié le rôle de l'adiponectine sur l'absorption du glycogène par les cellules placentaires, ainsi que le devenir et l'utilisation de ce polysaccharide dans le placenta humain.

Enfin, dans une **troisième partie**, nous avons étudié les effets de l'adiponectine sur le métabolisme énergétique (transport des nutriments, catabolisme du glucose, fonction mitochondriale) et l'apoptose dans les CTV issus de placenta de premier trimestre. En effet, une dérégulation de l'une de ces deux voies semblent associées à la survenue de pathologies fœtales telles que le retard de croissance *in utero* ou à l'inverse, la macrosomie. Ainsi, nous avons pu préciser les mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle de la croissance fœtale par l'adiponectine.

#### Collaborations avec le CHI de Poissy-Saint-Germain-en-Laye (CHIPS)

Les études *in vitro* effectuées au cours de ce travail ont été intégralement réalisées à partir de **cultures primaires** de CSE ou de CTV. Ainsi, les CSE sont issues de **biopsies endométriales** réalisées chez des femmes effectuant un bilan d'infertilité dans le département de biologie de la reproduction du CHIPS. Les CTV sont isolés à partir de **placentas de premier trimestre** obtenus chez des femmes majeures, suite à une interruption volontaire de grossesse (IVG). Pour les IVG dites précoces (inférieures à 7 semaines de grossesse) le protocole d'interruption est médicamenteux et se déroule au sein de l'unité d'orthogénie du CHIPS. Les IVG tardives (effectuées entre 7 et 12 semaines de grossesse) sont réalisées par aspiration, sous anesthésie locale ou générale, au bloc opératoire du CHIPS.

Le CHIPS est classé « **Centre de Référence** » par le Ministère de la Santé concernant les faussescouches spontanées à répétition. Ainsi, nous avons pu collecter des prélèvements sanguins au sein d'une population de femmes atteintes de cette pathologie et sur une population de femmes saines représentées par des donneuses d'ovocytes.

Ainsi, le bon déroulement de cette thèse est étroitement lié au dialogue permanent et à l'étroite collaboration avec le personnel du CHIPS (médecins, sages-femmes, personnel soignant, secrétaires) qui a permis le recrutement de toutes les femmes incluses dans cette étude et la réalisation de l'ensemble des gestes médicaux nous permettant d'obtenir les prélèvements tissulaires ou sanguins dont nous avions besoin.

En parallèle, les membres de l'EA-7404 réalisent par RT-qPCR des mesures d'expression d'un répertoire de cytokines pro- et anti-inflammatoires sur les biopsies endométriales prélevées chez les femmes souffrant d'échecs répétés d'implantation. L'objectif est de donner aux médecins une information sur le profil inflammatoire de l'endomètre de ces femmes, dans le but d'améliorer les chances de grossesse suite à une prise en charge personnalisée en assistance médicale à la procréation.

## PARTIE 3 RÉSULTATS

CHAPITRE 1 | DÉCIDUALISATION ET CONTRÔLE DE L'INVASION

## **R**ÔLES DE L'ADIPONECTINE DANS L'ENDOMÈTRE

## **E**FFETS SUR LA DÉCIDUALISATION ET SUR LE CONTRÔLE DE L'INVASION TROPHOBLASTIQUE

## ARTICLE 1

## Adiponectin limits differentiation and trophoblast invasion in human endometrial cells

**Fabien Duval**, Esther Dos Santos, Hadia Moindjie, Valérie Sérazin, Nelly Swierkowski-Blanchard, François Vialard, Marie-Noëlle Dieudonné

JOURNAL OF MOLECULAR ENDOCRINOLOGY (2017)

• 173 •

#### Introduction

Chez toutes les espèces placentaires, l'implantation embryonnaire est une étape clé de la gestation, que celle-ci soit naturelle ou assistée. Chez l'espèce humaine, l'implantation embryonnaire est un processus complexe qui a lieu au cours d'une période de réceptivité utérine appelée « fenêtre implantatoire » idéalement comprise entre les jours 20 et 24 du cycle menstruel. Elle débute par l'apposition puis l'adhésion d'un embryon compétent (stade blastocyste) aux cellules endométriales de l'utérus. Une invasion profonde du stroma utérin par les cellules du trophoblaste de l'embryon est alors observée. Cette phase d'invasion est caractéristique des espèces dont la placentation est dite hémochoriale (primates, rongeurs...).

L'invasion trophoblastique nécessite une maturation adéquate de l'endomètre acquise au cours d'un processus de différenciation cellulaire appelé décidualisation. Sous l'influence des hormones ovariennes (17β-estradiol et progestérone), les cellules stromales endométriales (CSE) se différencient en cellules déciduales. Ces cellules sécrètent alors des facteurs diffusibles qui ont pour rôle de remodeler le stroma utérin et de permettre la mise en place de la réceptivité utérine. Ce remodelage de l'endomètre au cours de la décidualisation a également pour but de contrôler l'invasion trophoblastique qui ne doit être ni trop profonde, ni trop superficielle afin de ne pas induire la survenue de grossesses pathologiques liées à un défaut d'invasion (pré-éclampsie, retard de croissance intra-utérin, fausses-couches spontanées) ou à l'inverse à un excès d'invasion (placenta accreta, choriocarcinome).

Différentes familles moléculaires sont impliquées dans le contrôle de l'invasion trophoblastique par l'endomètre. En effet, au cours de la phase d'invasion, les cellules trophoblastiques ainsi que les cellules déciduales sécrètent des enzymes appelées MMP (metalloproteinases) dont le rôle est de digérer la matrice extracellulaire (MEC) de l'endomètre afin de faciliter l'enfouissement de l'embryon au sein du stroma utérin. L'action de ces MMP est contrôlée par leurs inhibiteurs spécifiques, appelés TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases). Les TIMP et les MMP sont produits à la fois par les cellules placentaires et par les cellules endométriales. En régulant cette balance MMP/TIMP, les cellules déciduales de l'endomètre participent donc au remodelage de la MEC, indispensable à une implantation embryonnaire correcte.

L'adiponectine est une protéine qui, outre ces effets métaboliques, contrôle les processus de mort, de prolifération et de différenciation cellulaires. En particulier, cette adipokine exerce des effets antiprolifératifs et pro-apoptotiques dans les cellules cancéreuses de la glande mammaire et de la prostate. Elle exerce également une action pro-différenciante dans plusieurs types cellulaires, tels que les adipocytes, les cellules endothéliales et les cellules trophoblastiques villeuses. Alors que son rôle dans le placenta humain est de plus en plus décrit, les données concernant son rôle dans l'endomètre son relativement pauvres.

Il est clairement démontré que l'endomètre humain exprime les récepteurs spécifiques de l'adiponectine, ADIPOR1 et ADIPOR2 suggérant que l'endomètre constitue un tissu cible de cette protéine. Des études suggèrent également l'importance du signal adiponectine dans l'endomètre humain, au cours de l'implantation embryonnaire. En effet, l'expression des récepteurs ADIPOR1 et ADIPOR2 est maximale dans l'endomètre au milieu de la phase sécrétoire, correspondant à la fenêtre implantatoire. De plus, les endomètres de femmes infertiles souffrant d'échecs répétés d'implantation sous-expriment ces deux récepteurs, comparativement aux femmes fertiles. Ces données suggèrent que l'adiponectine pourrait jouer un rôle important dans la maturation de l'endomètre humain, notamment au cours de la décidualisation, du remodelage de la MEC, et du contrôle de l'invasion trophoblastique.

Dans ce contexte, nous avons souhaité étudier le rôle de l'adiponectine (i) au cours de la décidualisation des CSE humaines et (ii) sur le contrôle de l'invasion trophoblastique par l'endomètre.

#### Matériels et Méthodes

**Population d'étude**. Cette étude a été réalisée à partir de biopsies endométriales réalisées au CHIPS, chez des femmes réalisant un diagnostic de fertilité. Ces biopsies sont effectuées durant la fenêtre implantatoire. Les patientes incluses dans cette étude sont au nombre de 23 et ont un âge compris entre 27 ans et 40 ans. L'âge moyen est de  $34,3 \pm 0,8$  ans.

**Isolement des CSE humaines**. Les biopsies sont tout d'abord lavées abondamment dans du sérum physiologique froid en présence d'antibiotiques, afin d'éliminer les éventuelles traces de sang. Puis, le tissu endométrial est émincé en fragments de 1 mm<sup>3</sup> environ qui sont ensuite digérés en deux étapes.

• 175 •

<u>Digestion 1</u> : Les fragments sont incubés 1 heure à 37°C dans un milieu DMEM/F12 contenant de la collagénase A (0,1%), de la DNAse de type I (0,5 ‰) et des antibiotiques (pénicilline (10  $\mu$ g/ml) et streptomycine (100 U/ml)). A l'issue de cette première digestion, le surnageant contenant les CSE est filtré sur une membrane de nylon (100  $\mu$ m) et centrifugé 10 minutes à 200g. Le culot cellulaire issu de cette centrifugation est ensuite repris dans un milieu de lavage (DMEM/F12 et antibiotiques) et centrifugé à nouveau 10 minutes à 200g.

<u>Digestion 2</u> : En parallèle, le tissu endométrial non-digéré subit une seconde digestion de 10 minutes à 37°C dans un milieu DMEM/F12 contenant de la trypsine (0,25%), de la DNAse de type I (0,1%), de l'EDTA (0,03%) et des antibiotiques (pénicilline (10  $\mu$ g/ml) et streptomycine (100 U/ml)). L'action de la trypsine est ensuite inhibée par l'ajout (volume/volume) de milieu de culture composé de DMEM/F12 contenant du sérum de veau fœtal (10%) et des antibiotiques (pénicilline (10  $\mu$ g/ml) et streptomycine (100 U/ml)). Le produit de cette digestion est filtré sur une membrane de nylon (40  $\mu$ m) et centrifugé 10 minutes à 200g.

Les culots cellulaires issus de ces deux digestions sont réunis. Les CSE sont ensemencées dans un milieu de culture composé de DMEM/F12 contenant du sérum de veau fœtal (10%) et des antibiotiques (pénicilline (10  $\mu$ g/ml) et streptomycine (100 U/ml)) et placées à 37°C sous 5% CO<sub>2</sub> en atmosphère humide. Le lendemain, les cellules sont lavées afin d'éliminer les hématies et les débris cellulaires. Les cellules sont maintenues en présence du milieu de culture décrit ci-dessus pendant 48 heures, temps nécessaire pour que les CSE atteignent un état de confluence proche de 100%.

**Différenciation des CSE en cellules déciduales**. Lorsque la confluence des CSE est atteinte, la décidualisation est induite. Les CSE sont mises en présence d'un milieu de différenciation constitué de DMEM/F12 contenant du sérum de veau fœtal traité au charbon (2%), de la progestérone ( $10^{-6}$  M), du 17 $\beta$ -estradiol ( $10^{-8}$  M) et des antibiotiques (pénicilline ( $10 \ \mu g/ml$ ) et streptomycine ( $100 \ U/ml$ )), supplémenté ou non en adiponectine ( $25 \ ng/ml$  ou  $250 \ ng/ml$ ). La décidualisation *in vitro* est réalisée pendant 15 jours.

Validation du protocole d'isolement des CSE. Afin de vérifier la pureté de la préparation cellulaire, des expériences d'immunocytochimie sur les cellules endométriales ont été réalisées. Le marquage de

• 176 •

la vimentine a été utilisé comme marqueur spécifique des cellules stromales et le marquage de la cytokératine a été utilisé comme marqueur des cellules épithéliales. Au cours des 15 jours de différenciation *in vitro*, le dosage de la prolactine dans les surnageants de culture cellulaire a été réalisé. En effet, la prolactine est un marqueur spécifique de la différenciation des CSE en cellules déciduales.

**Caractérisation du système adiponectine dans les CSE**. L'expression des gènes codant l'adiponectine et ses deux récepteurs ADIPOR1 et ADIPOR2, a été analysée par RT-qPCR. La présence des protéines a été confirmée par immunoblot.

**Etude de la différenciation** *in vitro* **des CSE en cellules déciduales**. Au cours de leur différenciation, les cellules déciduales sécrètent des protéines qui leur sont propres. Outre la prolactine, les cellules déciduales expriment l'IGFBP-1 et la connexine-43 en grandes quantités. Ces trois protéines sont donc utilisées comme marqueurs de décidualisation. L'expression de la prolactine, de l'IGFBP-1 et de la connexine-43 a été étudiée par RT-qPCR au cours de la différenciation cellulaire *in vitro*, en présence ou non d'adiponectine. La sécrétion de prolactine dans les surnageants de culture a aussi été mesurée.

**Etude du contrôle de l'invasion trophoblastique par les cellules déciduales**. L'étude des capacités invasives de cellules trophoblastiques en réponses aux molécules sécrétées par les cellules déciduales a été réalisée en utilisant la lignée cellulaire trophoblastique HTR-8/SVneo, qui possède des capacités invasives. Les tests d'invasion sont réalisés dans des inserts présentant une membrane poreuse, sur laquelle une fine couche de Matrigel est ajoutée, afin de mimer une MEC artificielle. Les cellules HTR-8/SVneo sont cultivées dans un milieu RPMI contenant de l'Hepes 1M (2%), du sérum de veau fœtal (10%) et des antibiotiques (pénicilline (10 µg/ml) et streptomycine (100 U/ml)) jusqu'à atteindre un état de confluence. Elles sont ensuite resuspendues dans un milieu conditionné issu de CSE cultivées pendant 15 jours en présence ou non d'adiponectine et placées dans l'insert pendant 48 heures à 37°C. Les noyaux des cellules HTR-8/SVneo invasives sont colorés au Hoechst, observés par microscopie confocale, puis comptés. Les cellules sont considérées comme invasives lorsqu'elles ont digéré le Matrigel et se sont retrouvées de l'autre côté de la membrane poreuse de l'insert.

**Etude du système MMP/TIMP**. Afin d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle de l'invasion trophoblastique par l'endomètre, l'activité des MMP et l'expression de leurs inhibiteurs, les TIMP, ont été étudiées. L'activité des MMP-2,-9 a été mesurée par zymographie en gélatine dans les surnageants de CSE non-différenciées, en cours de différenciation, et différenciées. En parallèle, l'expression de TIMP-1,-2,-3 a été analysée par RT-qPCR dans les CSE au cours de leur décidualisation.

**Invalidation de ADIPOR1 et ADIPOR2**. Afin de vérifier que les effets de l'adiponectine sur la décidualisation et le contrôle de l'invasion trophoblastique sont médiés par l'intermédiaire de ses deux récepteurs spécifiques, l'expression de ADIPOR1 et ADIPOR2 a été inhibée par l'utilisation de petits ARN interférents (siRNA). Un siRNA contrôle a également été utilisé (siNS). Après 13 jours de culture, les CSE en cours de décidualisation sont transfectées avec siNS (10 nM), siADIPOR1 (25 nM) et siADIPOR2 (25 nM). Le lendemain, l'adiponectine (250 ng/ml) est ajoutée. Après 24 heures de culture en présence d'adiponectine (le 15<sup>ème</sup> jour après l'isolement cellulaire), les cellules sont lysées. L'invalidation de ADIPOR1 et ADIPOR2 est vérifiée par RT-qPCR et par immunoblot. Les effets de cette invalidation sur la décidualisation est analysée en mesurant l'expression de la connexine-43 et de l'IGFBP-1 par RT-qPCR. L'impact de l'invalidation des ADIPOR sur le contrôle de l'invasion trophoblastique est estimé en réalisant des tests d'invasion comme décrits précédemment.

#### Résultats et Conclusions

Nous avons tout d'abord confirmé par des expériences d'immunocytochimie que les cellules endométriales isolées étaient effectivement des CSE. En effet, 95% des cellules endométriales se sont révélées positives pour la vimentine, le marqueur stromal. Ce résultat a été confirmé en dosant la sécrétion de prolactine dans les surnageants de culture cellulaire. En effet, nous avons observé que la production de cette hormone par les CSE augmente progressivement au cours de la mise en différenciation  $(16 \pm 3, 66 \pm 16, 571 \pm 157, 2374 \pm 607 \text{ mUI/}\mu\text{g}$  de protéines après 1, 3, 8 et 15 jours de culture cellulaire, respectivement), permettant également de **valider notre protocole de différenciation cellulaire in vitro**.
Dans un second temps, nous avons mesuré l'expression de l'adiponectine et de ses récepteurs ADIPOR1 et ADIPOR2 dans les CSE au cours de leur différenciation (D3, D8 et D15). Nos résultats de RT-qPCR démontrent que les CSE expriment ADIPOR1 et ADIPOR2, que celles-ci soient différenciées ou non. En outre, nous observons que l'expression de ces deux récepteurs semble doubler entre D3 et D15 de culture. Ces données ont été confirmées par immunoblot et suggèrent que **les CSE constituent des cellules cibles de l'adiponectine**. En revanche, l'adiponectine ne semble pas être exprimée dans ce type cellulaire.

Nos premiers résultats suggérant que les CSE sont des cibles de l'adiponectine, nous avons pu nous intéresser au rôle de cette adipokine au cours de la décidualisation. Pour cela, nous avons étudié par RTqPCR, l'expression de la prolactine, de l'IGFBP-1 et de la connexine-43 au cours de la différenciation cellulaire (D3, D8 et D15). Nous avons mesuré tout d'abord une augmentation significative de l'expression de ces trois marqueurs de décidualisation entre D3 et D15, validant une nouvelle fois notre protocole de différenciation *in vitro*. De plus, en présence d'adiponectine, nous avons observé une diminution de l'expression de l'IGFBP-1 (-72% et -53% à 25 ng/ml et 250 ng/ml, respectivement) et de la connexine-43 (-41% et -37% à 25 ng/ml et 250 ng/ml, respectivement) dans les CSE à D15 de culture cellulaire. Concernant la prolactine, nous n'observons pas d'effets de l'adiponectine en RT-qPCR. En revanche, une importante diminution de la sécrétion de prolactine par les CSE est observée à D15, en présence d'adiponectine (-27% et -49% à 25 ng/ml et 250 ng/ml, respectivement). L'ensemble de ces résultats suggère que **l'adiponectine freine la différenciation des CSE en cellules déciduales**.

Les cellules déciduales jouent un rôle majeur dans le contrôle de l'invasion trophoblastique. Ainsi, nous avons observé que lorsque les cellules trophoblastiques HTR-8/SVneo sont cultivées avec des milieux conditionnés issus de CSE maintenues en culture en présence d'adiponectine pendant 15 jours, le potentiel invasif de ces cellules est altéré (-17% et -32% à 25 ng/ml et 250 ng/ml, respectivement). Il semble donc que **l'adiponectine induit la production de facteurs endométriaux limitant l'invasion trophoblastique**.

De nombreuses molécules interviennent dans les mécanismes de régulation de l'invasion trophoblastique. Parmi celles-ci figure le système MMP/TIMP qui semble avoir un rôle central. Par des

expériences de zymographie en gélatine, nous avons mesuré l'activité des MMP sécrétées par les CSE non-différenciées (D1), en cours de différenciation (D8) et différenciées (D15). Nos résultats démontrent que l'activité de MMP-2 et MMP-9 est augmentée au cours de la décidualisation. Les zymogrammes révèlent également que les CSE non-différenciées sécrètent une troisième MMP, correspondant potentiellement à MMP-3. En revanche l'activité de cette MMP disparaît au cours de la décidualisation. Ces données suggèrent fortement qu'**un remodelage de la MEC endométriale a lieu au cours de la décidualisation**. De plus, nous observons que l'adiponectine diminue l'activité de MMP-2 (-19%) et MMP-9 (-19%) à D8, uniquement pour la plus forte dose testée (250 ng/ml). En revanche, à D15, l'adiponectine diminue l'activité de MMP-2 (-11% et -15% à 25 ng/ml et 250 ng/ml, respectivement) et de MMP-9 (-28% et -31% à 25 ng/ml et 250 ng/ml, respectivement). Les effets anti-invasifs de l'adiponectine semblent donc corrélés à la diminution de l'activité de MMP-2 et MMP-9 dans l'endomètre humain.

Afin de préciser les cibles moléculaires impliquées dans les effets anti-invasifs de l'adiponectine, nous nous sommes intéressés à l'expression de TIMP-1,-2,-3. Ces trois isoformes sont exprimées dans l'endomètre humain. Nos résultats de RT-qPCR ne démontrent pas de modification d'expression de TIMP-1 et TIMP-2 au cours de la décidualisation des CSE, que celles-ci soient placées en présence d'adiponectine ou non. Cependant, nous observons une forte augmentation de l'expression de TIMP-3 au cours de la différenciation cellulaire (entre D3 et D15). Cette augmentation est amplifiée en présence d'adiponectine à 25 ng/ml (+117%, +81% et +69% à D3, D8 et D15, respectivement) et 250 ng/ml (+122%, +100% et +125% à D3, D8 et D15, respectivement). Associée à la réduction de l'activité de MMP-2 et MMP-9, l'augmentation de l'expression de TIMP-3 semble donc participer aux effets anti-invasifs de l'adiponectine dans l'endomètre.

Dans une dernière partie nous avons souhaité invalidé par ARN interférents les deux récepteurs spécifiques de l'adiponectine, ADIPOR1 et ADIPOR2 dans les CSE. Nos résultats de RT-qPCR valident notre protocole d'invalidation. Nous observons une réduction significative de l'expression de ADIPOR1 et ADIPOR2 après transfection des CSE par les siADIPOR (-56% pour ADIPOR1 et -58% pour ADIPOR2). Ces résultats ont été confirmés par immunoblot. Nous avons également observé que la

suppression des récepteurs spécifiques de l'adiponectine entraîne la disparition des effets antidifférenciants et anti-invasifs de cette adipokine dans les cellules endométriales, suggérant que **les récepteurs ADIPOR1 et ADIPOR2 sont impliqués dans ces effets**.

### Discussion

Cette étude a permis de mettre en évidence que les CSE n'expriment pas l'adiponectine. Les travaux qui ont démontré la présence d'adiponectine dans l'endomètre ont été réalisés à partir de tissu entier, présentant de nombreux types cellulaires (cellules épithéliales, cellules immunitaires, vaisseaux sanguins...). Il ne peut donc pas être exclu que l'adiponectine soit produite par l'un de ces types cellulaires dans l'endomètre. En revanche, les CSE expriment ADIPOR1 et ADIPOR2.

Nous avons observé des effets anti-différenciants et anti-invasifs de l'adiponectine dans l'endomètre humain. De manière intéressante, des études antérieures réalisées au sein du laboratoire ont décrit un rôle pro-différenciant et pro-invasif de l'adiponectine dans le placenta humain. L'ensemble de ces résultats suggère que l'adiponectine, par ce double contrôle dans les deux tissus formant l'interface fœto-maternelle, constitue ainsi un régulateur clé de l'implantation embryonnaire et particulièrement de l'invasion trophoblastique.

De nombreuses pathologies de la grossesse apparaissent suite à un défaut ou à un excès d'invasion. L'adiponectine pourrait donc être impliquée dans la survenue de grossesses pathologiques, en modulant les capacités invasives du trophoblaste, dans le placenta lui-même, mais également dans l'endomètre.

### Adiponectin's roles during F DUVAL and others

Research

**Adiponectin limits differentiation and** trophoblast invasion in human endometrial cells

### Fabien Duval<sup>1</sup>, Esther Dos Santos<sup>1,2</sup>, Hadia Moindjie<sup>1</sup>, Valérie Serazin<sup>1,2</sup>, Nelly Swierkowski-Blanchard<sup>1,3</sup>, François Vialard<sup>1,3</sup> and Marie-Noëlle Dieudonné<sup>1</sup>

<sup>1</sup>GIG – EA 7404, Université de Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines, Université Paris-Saclay, Unité de Formation et de Recherche des Sciences de la Santé Simone Veil, Montigny-le-Bretonneux, France <sup>2</sup>Service de Biologie Médicale, Centre Hospitalier de Poissy-Saint Germain, Poissy, France <sup>3</sup>Département de Biologie de la Reproduction, Cytogénétique, Gynécologie et Obstétrique, Centre Hospitalier de Poissy-Saint Germain, Poissy, France

### Abstract

Successful human embryo implantation requires a proper differentiation of endometrial stromal cells (ESCs) into decidual cells, during a process called decidualization. ESCs express specific molecules, such as prolactin, insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) and connexin-43. Decidual cells are also involved in the control of trophoblast invasion, by secreting various factors, such as matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). Adiponectin is an adipokine with insulin-sensitizing, anti-inflammatory and anti-proliferative effects. At the embryomaternal interface, adiponectin promotes differentiation and invasion of human trophoblastic cells. We hypothesize that the effects of adiponectin on endometrium could counteract its pro-invasive effects previously described in the human trophoblast. In this context, we have firstly demonstrated that adiponectin downregulates IGFBP-1 and connexin-43 mRNA expressions, as well as prolactin secretion in ESCs, suggesting an anti-differentiative effect of adiponectin. Secondly, we found that invasive capacities of trophoblastic cell line HTR-8/SVneo are reduced in the presence of conditioned media from ESC cultured in the presence of adiponectin. Adiponectin's anti-invasive action is associated with a decreased activity of MMP-2 and MMP-9, and an increased TIMP-3 mRNA expression in ESCs. Finally, adiponectin receptors (ADIPOR1 and ADIPOR2) knockdown abolishes the anti-differentiative and anti-invasive effects of adiponectin in human ESCs. Altogether, our results suggest that adiponectin reduces the decidualization process and inversely induces the production of endometrial factors that limit trophoblast invasion. Thus, through a dual control in trophoblast and endometrial cells, adiponectin appears as a pivotal actor of the embryo implantation process.

### Correspondence should be addressed to M-N Dieudonné Email marie-noelle.dieudonne@ uvsq.fr

### **Key Words**

- adiponectin
- decidualization
- embryo implantation
- human endometrium
- trophoblast invasion

Journal of Molecular Endocrinology (2017) 59, 285-297

### Introduction

Human embryo implantation is a multi-step process that begins with apposition of trophoblastic cells from a competent blastocyst to the maternal endometrium. This

http://ime.endocrinology-iournals.org DOI: 10.1530/JME-17-0046

© 2017 The authors Published by Bioscientifica Ltd. Printed in Great Britain apposition occurs during the 'window of implantation', a short period of uterine receptivity corresponding to the mid-secretory phase of the menstrual cycle



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License

285-297

**59:** 3

. human decidualization

F DUVAL and others

Adiponectin's roles during human decidualization **59**:3

(Diedrich *et al.* 2007). After the blastocyst has attached to the endometrial epithelium, its extravillous trophoblasts (EVTs) penetrate into the endometrial stroma and acquire an invasive phenotype resulting in the placenta anchoring in the endometrium (Lunghi *et al.* 2007).

Research

During trophoblast invasion, EVTs secrete large amounts of matrix metalloproteinases (MMPs) (Burrows et al. 1996). The actions of MMP-2 and MMP-9 are crucial for trophoblast invasion (Staun-Ram et al. 2004). Indeed, these gelatinases are able to degrade the major component of the endometrial extracellular matrix (ECM) i.e. collagen IV (Burrows et al. 1996). MMP activity is regulated by specific tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs), which bind and inactivate MMPs with a 1:1 stoichiometry (Huppertz et al. 1998). Thus, correct regulation of the MMP/TIMP balance in EVTs is essential for an appropriate embryo implantation (Nissi et al. 2013). Trophoblast invasion also requires adequate endometrial receptivity (Singh et al. 2011). This is characterized by morphological, biochemical and vascular modifications, including (i) the appearance of epithelial pinopodes, (ii) the modulated expression of cytokines, growth factors and adhesion molecules (particularly the upregulation of epithelial αv- and  $\beta$ 3-integrins), (iii) the disappearance of an adhesive molecular surface (loss of mucin-1 and mucin-12) and (iv) the decidualization of endometrial stromal cells (ESCs). Decidualization occurs in response to the ovarian hormones, 17<sub>β</sub>-estradiol (E2) and progesterone (P4). It is accompanied by the secretion of prolactin and insulinlike growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1), and the expression of the gap junction connexin-43 (CX-43) in human ESCs (Brar et al. 1995, Yu et al. 2011). Decidual ECM remodeling events have also been observed. These processes are associated with MMP-2,-9 secretion and the modulation of TIMP-1,-2,-3 expression in human ESCs (Zhang & Salamonsen 1997, Estella et al. 2012, Tapia-Pizarro et al. 2013). This type of ECM remodeling enhances ESC motility and thus facilitates trophoblastic infiltration into the endometrial stroma (Grewal et al. 2008). Decidual ECM remodeling is a complex process, tightly controlled by factors intrinsically produced by both placental and decidual cells (Sharma et al. 2016). For example, human chorionic gonadotropin (hCG) and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) facilitate EVT migration by enhancing endometrial MMP-2,-9 activities and by inhibiting endometrial TIMP-1 secretion (Haider & Knöfler 2009, Tapia-Pizarro et al. 2013). Conversely, the antifungal antibiotic trichostatin A limits trophoblast invasion by increasing the production of TIMP-1,-3 by

ESCs and reducing the activity of endometrial MMP-2,-9 (Estella *et al.* 2012). Hence, the local MMP/TIMP balance, at the invasion site, requires an appropriate interaction between trophoblasts and ESCs.

Adiponectin is a 30kDa cytokine, predominantly produced by adipose tissue (Kern et al. 2003). Adiponectin exerts its action via two specific receptors (ADIPOR1 and ADIPOR2) containing seven transmembrane domains but which are structurally and functionally distinct from G-protein-coupled receptors (Yamauchi et al. 2003a). By binding to ADIPORs, adiponectin activates a variety of targets, such as protein kinase A, phosphoinositide-3 kinase, mitogen-activated protein kinase and most notably, the AMP-activated protein kinase through which adiponectin exerts its insulin-sensitizing effects (Yamauchi et al. 2003a, Campos et al. 2008). This adipokine has also been shown to exert anti-inflammatory, anti-angiogenic, antiatherosclerotic, anti-proliferative and pro-apoptotic roles in various cell types (Yamauchi et al. 2003b, Dieudonne et al. 2006, Duval et al. 2016).

During pregnancy, adiponectin seems to act as an endo/paracrine signal at the embryo-maternal interface. It is now established that adiponectin is not produced by human trophoblastic cells but seems to be expressed in human endometrium (Takemura *et al.* 2006, Benaitreau *et al.* 2010*a*, Dos Santos *et al.* 2012). ADIPOR1 and ADIPOR2 are expressed in human placenta and endometrium (Takemura *et al.* 2006, Benaitreau *et al.* 2009). A growing body of evidence has highlighted adiponectin role in the establishment of a functional placenta (Benaitreau *et al.* 2010*b*). Our laboratory has shown that adiponectin promotes human trophoblast invasion by enhancing MMP-2,-9 activities and downregulating *TIMP-2* mRNA expression (Benaitreau *et al.* 2010*a*).

However, little is known about adiponectin effects in human endometrium. A study showed that expression of ADIPOR1 and ADIPOR2 peaks in the mid-secretory phase of menstrual cycle (Takemura et al. 2006). We have also observed significantly low endometrial expression of ADIPOR1 and ADIPOR2 in women with unexplained recurrent implantation failure relative to fertile women (Dos Santos et al. 2012). In vitro, adiponectin exerts an anti-proliferative action by promoting cell death (Bohlouli et al. 2013). Taken as a whole, these data strongly suggest that adiponectin plays a crucial role during embryo implantation. With a view to better understand embryomaternal dialog in the early stages of pregnancy, we studied the in vitro effects of adiponectin on (i) the human ESC decidualization program and (ii) the endometrial control of trophoblast invasion.

http://jme.endocrinology-journals.org DOI: 10.1530/JME-17-0046

Published by Bioscientifica Ltd

Research

F DUVAL and others

Adiponectin's roles during human decidualization **59**:3

### **Materials and methods**

### Materials

Dulbecco's Modified Eagle's Medium and Ham F-12 Nutrient Mix (DMEM/F12), Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium, progesterone, E2, penicillin, streptomycin, DNase type I, EDTA, leupeptin, aprotinin, 4-(2-aminoethyl)-benzene-sulfonyl fluoride (AEBSF), sodium fluoride and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma Chemical Co. Fetal calf serum (FCS) was purchased from Gibco (Invitrogen). Recombinant human adiponectin was provided by R&D Systems Europe Ltd. Superscript III RNase H-RT and primers were from Invitrogen, and RNase inhibitor was obtained from AMRESCO (Solon, OH, USA). Nucleospin RNA II kit was obtained from Machery-Nagel (Düren, Germany). Trypsin was provided by Difco Laboratories (Detroit, MI, USA). Matrigel was obtained from BD Biosciences (Le Pont-de-Claix, France) and collagenase A was from Boehringer (Mannheim, Germany). The suppliers of the various antibodies used are described in the corresponding paragraphs below.

### Study population and tissue collection

A total of 23 normally cycling women aged 27–40 undergoing biopsy for fertility evaluation, were recruited into the present study. Endometrial tissues were obtained during the window of implantation. Patients with low endometrial volume (<2 cm) or presence of submucous fibroma or polyps were excluded. A good hormonal reserve and normal responses to ovarian stimulation were also included as additional criteria. This study was approved by the local investigational review board (Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Médicale, approval reference protocol 01-78). All participants provided their informed consent before tissue sampling.

### Human ESC culture

Human ESCs were isolated and cultured as described by González and coworkers (Gonzalez *et al.* 1999). Briefly, tissue samples were minced into small pieces and digested in a two-step process. Tissues were incubated for 1 h at 37°C in a phenol-red-free DMEM/F12 medium containing collagenase (0.1%), DNase type I (0.0005%), penicillin ( $10 \mu g/mL$ ) and streptomycin (100 U/mL).

The supernatant was filtered through a  $100\,\mu\text{m}$  nylon screen and then centrifuged at  $200\,g$  for  $10\,\text{min}$ . A second enzymatic digestion was performed on undigested tissue for  $10\,\text{min}$  at  $37^\circ\text{C}$  in DMEM/F12 medium-containing trypsin (0.25%), DNase type I (0.1%), EDTA (0.03%), penicillin ( $10\,\mu\text{g/mL}$ ) and streptomycin ( $100\,\text{U/mL}$ ). The digested tissue was filtered through a  $40\,\mu\text{m}$  nylon screen and then centrifuged at  $200\,g$  for  $10\,\text{min}$ . Cell pellets from both digestions were pooled and centrifuged at  $200\,g$  for  $10\,\text{min}$ .

Cells were cultured in DMEM/F12 medium supplemented with streptomycin (10µg/mL), penicillin (100 U/mL) and FCS (10%) at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> and 95% air atmosphere. When the cells reached confluence, they were cultured in the presence or absence of adiponectin (25 ng/mL and 250 ng/mL) in differentiation medium containing DMEM/F12 with E2 (10<sup>-8</sup>M), P4 (10<sup>-6</sup>M), charcoal-stripped FCS (2%), penicillin (10µg/mL) and streptomycin (100 U/mL) for 15 days. Media were changed every 2 days.

### Immunocytochemistry

Endometrial cells were washed three times in phosphatebuffered saline (PBS) and fixed with paraformaldehyde (4%) for 30 min at room temperature. Cells were permeabilized for 5 min with PBS-Triton X-100 (0.2%). Non-specific binding was prevented by incubation with BSA (3%) in PBS for 1 h at room temperature. Vimentin (mouse anti-human monoclonal, 1:50, clone V9, 790-2917, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) and pan-cytokeratin (mouse anti-human monoclonal, 1:50, clone KL1, Mob 191-05, Diagnostic Biosystems, Pleasanton, CA, USA) were chosen as stromal and epithelial markers, respectively (Merviel et al. 1995). The labeled cells were then rinsed with PBS and incubated with an Alexa-488-conjugated goat-antimouse secondary antibody (1:400,  $A_{max}/E_{max}$ : 488/519, A-11001, Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific Inc.) for 1h at room temperature. Cell nuclei were counterstained with 1µg/mL Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich). As a negative control, endometrial cells were processed in the absence of primary antibody. Immunostained samples were observed using an automated inverted microscope (ScanR, Olympus, Rungis, France). Positive cells were counted on five randomly selected fields by the post-imaging procedure in ImageJ software.

http://jme.endocrinology-journals.org DOI: 10.1530/JME-17-0046

<sup>© 2017</sup> The authors Printed in Great Britain

# Research F DUVAL and others Adiponectin's roles during

Adiponectin's roles during human decidualization

**59**:3

## Invasion assay for HTR-8/SVneo cells co-cultured with ESC culture medium

The invasiveness of trophoblastic cells in response to ESCsecreted molecules was assessed using the HTR-8/SVneo immortalized EVT cell line, kindly provided by Dr Nadia Alfaidy (CEA Grenoble, France) in agreement with Dr Charles Graham. HTR-8/SVneo cells were cultured in RPMI medium supplemented with HEPES 1M (2%), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL) and FCS (10%) until they reached confluence. Invasion assays were performed in 24-well plates containing Matrigel-coated polycarbonate membrane (pore size: 8µm) invasion chamber inserts (Greiner Bio-One SAS, Courtaboeuf, France), according to the modified protocol from Tapia-Pizarro and coworkers (Tapia-Pizarro et al. 2013). HTR-8/SVneo cells were suspended ( $5 \times 10^4$  cells per well) in 250 µL of conditioned medium (CM) from 15-day-decidualized ESCs treated or not with adiponectin (25 ng/mL and 250 ng/mL). Media containing only E2 and P4 in the absence or presence of adiponectin (25 ng/mL and 250 ng/mL), were used as controls. RPMI medium supplemented with FCS (10%) was added to the lower well as a chemoattractant. After 48h of incubation at 37°C, medium containing noninvading cells was removed from the upper well. Invasive HTR-8/SVneo cells at the lower surface of the insert were washed and fixed with paraformaldehyde (4%) for 30 min. The nuclei were counterstained with 1µg/mL Hoechst reagent and visualized with an inverted laser scanning confocal microscope (Leica white light laser TCS SP8-X, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). On each insert, invasive cells were counted on five randomly selected fields by the post-imaging procedure in ImageJ software. Invasive cells were defined as those whose nucleus exceeded 8µm (i.e. the equivalent of a pore size).

### Zymography

After 1, 8 or 15 days of culture (D1, D8 and D15) with differentiation medium in the absence or presence of adiponectin (25 ng/mL and 250 ng/mL), total gelatinase activities from ESCs were analyzed by zymography. Aliquots of CM containing 60µg of protein were resolved under non-reducing conditions in 10% polyacrylamide gels containing 1mg/mL gelatin (Difco). Gels were washed in Triton X-100 (2.5%) for 30 min to remove SDS and incubated overnight at 37°C in a renaturing buffer (50 mM Tris–HCl, pH 7.5, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, and 0.02% sodium azide). Gels were stained with Coomassie Brilliant Blue, and destained in methanol/acetic acid

http://jme.endocrinology-journals.org DOI: 10.1530/JME-17-0046 © 2017 The authors Printed in Great Britain (20%/5% v/v). Proteolytic activity was identified as a clear band on a blue background. The images were scanned and quantitative enzyme analysis was carried out, using ImageJ software.

## Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR)

ESCs were seeded in 12-well culture plates  $(3.5 \times 10^5 \text{ cells})$ per well). After 3, 8 or 15 days of differentiation (D3, D8, D15), total RNA (0.1µg) from ESCs was extracted and reverse-transcribed, as previously described (Machinal-Quélin *et al.* 2002). Quantitative PCR was performed using the C1000 Thermal Cycler (CFX96 real-time system; BioRad, Hercules, CA, USA) and the primers sets indicated in Table 1. Final concentration of primers is 25µM. The three reference genes, ribosomal protein L13A (RP13), TATA box-binding protein (TBP) and β2-microglobulin were chosen as previously described (Benaitreau *et al.* 2009). For each sample, the concentration ratios (target/ three reference mRNA) were calculated using the BioRad CFX Manager software (version 3.0) and expressed in arbitrary units, as previously described (Duval *et al.* 2016).

PCR products were separated on a 2% agarose gel in 90 mM Tris-borate and 2 mM EDTA buffer (pH 8.0). They were visualized by staining with GelRed (Interchim, Montluçon, France) and UV transillumination.

### Immunoblotting

ESCs were seeded onto 6-well culture plates  $(2.0 \times 10^6)$ cells per well) and lysed on ice in buffer containing Tris (50 mM), NaCl (120 mM), EDTA (1 mM), Nonidet-P40 (1%), deoxycholate (0.1%), SDS (0.1%), sodium vanadate (1 mM),  $\beta$ -glycerophosphate (30 mM), aprotinin  $(5 \mu g/mL)$ , leupeptin (12.5 µg/mL), AEBSF (100 µg/mL) and sodium fluoride (10mM). Twenty micrograms of total proteins were resolved by SDS-PAGE (4-20% acrylamide) and wet-transferred onto nitrocellulose membranes. Next, the membranes were blocked and incubated overnight with anti-ADIPOR1 (goat anti-human polyclonal, 1:300, sc-46749, Santa Cruz Biotechnology), anti-ADIPOR2 (goat anti-human polyclonal, 1:300, sc-46756, Santa Cruz Biotechnology) or anti-β-actin (rabbit anti-human monoclonal, 1:500, Sigma Chemical). After washing, the membranes were incubated with the peroxidasecoupled secondary antibody, for 1 h at room temperature. Blots were developed using the SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific). Data were analyzed using ImageJ software.

Published by Bioscientifica Ltd

Primer set	Sequence	PCR product	Sequence
ADIPOR1			
Sense	5′TTC TTC CTC ATG GCT GTG ATG T 3′	71 bp	NM_001290629.1
Antisense	3'GCT TAA GGA CTC GCG AAG AA 5'		
ADIPOR2			
Sense	5'ATA GGG CAG ATA GGC TGG TTG A 3'	76 bp	NM_024551.2
Antisense	3′ACA TAC GAC GGG CCT AGG 5′		
ADIPONECTIN			
Sense	5′GTC ATT GTC ATT ATC AGC 3′	153 bp	NM_004797.3
Antisense	3'TAT CCA CTT CTC GTA TCG 5'		
PROLACTIN			
Sense	5'AGC CAG GTT CAT CCT GAA A 3'	99 b p	NM_000948.5
Antisense	3′TTC TCA GAG CGG AAA GAC GA 5′		
GFBP-1			
Sense	5′ATC ACA GCA GAC AGT GTG AGA 3′	71 bp	NM_000596.2
Antisense	3'CCA CGC AGA TGG GAA CCT TA 5'		
CONNEXIN-43			
Sense	5′TTA AGC AAA AGA GTG GTG CCC 3′	179bp	NM_000165.4
Antisense	3'GAC CCC TCT ACT CGT CAG AC 5'		
TIMP-3			
Sense	5'CAC CTC TCC ACG AAG TTG C 3'	117 bp	NM_000362.4
Antisense	3'GTG TCT CTG AGA GCC TTC GA 5'		
TBP			
Sense	5′TGC ACA GGA GCC AAG AGT GAA 3′	132 bp	NM_001172085.1
Antisense	3'CAC ATC ACA GCT CCC CAC CA 5'		
32-MICROGLOBULIN			
Sense	5'TGC TGT CTC CAT GTT TGA TGT ATC T 3'	86 bp	NM_004048.2
Antisense	3'TCT CTG CTC CCC ACC TCT AAG T 5'		
₹PL13A			
Sense	5′CCT GGA GGA GAA GAG GAA AGA GA 3′	125 bp	NM_012423.3
Antisense	3'TTG AGG ACC TCT GTG TAT TTG TCA A 5'		

### **RNA interference for ADIPOR1 and ADIPOR2**

Two pairs of small-interfering RNAs (siRNAs) corresponding to different regions of each receptor gene were chemically synthesized by Qiagen. The sequences of the sense siRNAs are given in Table 2. A fluorescently labeled, non-silencing control siRNA (siNS) was used to optimize the transfection conditions and as a control for nonspecific silencing effects. For the knockdown experiments, ESCs were plated in 12-well dishes at  $3.5 \times 10^5$  cells per well. After 13 days, cells were transfected with siNS (10nM) or siADIPOR1 (25 nM) or siADIPOR2 (25 nM) using a Lipofectamine RNAiMAX transfection reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Adiponectin (250 ng/mL) was added 24 h after

### Table 2 siRNA sequences.

Target	Sequence	
ADIPOR1	5'AAG GAC AAC GAC TAT CTG CTA 3'	
	5'CTG GCT AAA GGA CAA CGA CTA 3'	
ADIFORZ	5'CGG CTC TCC TTG AAT AAG AAA 3'	

http://jme.endocrinology-journals.org DOI: 10.1530/JME-17-0046 © 2017 The authors Printed in Great Britain transfection. mRNA expression was analyzed by RT-qPCR and protein expression was assessed using Western blot, as described previously.

289

### **Prolactin secretion**

Prolactin secretion into the culture medium was measured using an automated immuno-chemiluminescence system (KRYPTOR, B·R·A·H·M·S, Saint-Ouen, France). In order to compare the levels of prolactin secretion, results were normalized to  $1 \mu g$  of total protein. The protein concentration was measured according to Bradford's method, with BSA as the standard.

### **Statistical analyses**

Statistical analyses were performed on the raw data from 5 to 10 separate experiments. Comparisons between controls (absence of the adiponectin) at D1, D3, D8 and D15, were made using analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni P values. A non-parametric, paired Wilcoxon test was used to compare the effect of adiponectin concentration

Research

F DUVAL and others

Adiponectin's roles during human decidualization

290



(25 ng/mL or 250 ng/mL) with the control situation (the absence of adiponectin) for a given day of exposure.

### Results

### **Characterization of human ESCs**

To assess the purity of our cell preparation, immunocytochemistry experiments were performed, 48 h after cell isolation. We have studied the expression of vimentin and pan-cytokeratin, which are specific markers of endometrial stroma and epithelium, respectively. Our microscopy analyses revealed that 95% of isolated endometrial cells stained positive for vimentin and only 5% expressed pan-cytokeratin (Fig. 1). This clearly demonstrated that the great majority of isolated cells were ESCs. These latter results were confirmed by measuring prolactin secretion into cell culture supernatant, which is a specific marker of ESC decidualization. We showed

#### Figure 1

Isolated endometrial cells are human ESCs. After isolation, human endometrial cells were cultured in DMEM/F12 medium supplemented with E2 and P4. Vimentin (a stromal marker) and pancytokeratin (an epithelial marker) were revealed as described in the Materials and methods section. (A) Human endometrial cell stained with anti-vimentin antibody. (B) Human endometrial cell stained with anti-pan-cytokeratin antibody. (C) Negative staining control in the absence of primary antibody. The figure shows one of four separate, representative experiments. Magnification x40.

**59**:3

that this hormonal production increased progressively during cell differentiation ( $16\pm3$ ,  $66\pm16$ ,  $571\pm157$ , and  $2374\pm607$  IU/µg of protein after 1, 3, 8, and 15 days of cell culture, respectively).

### Expression of adiponectin and its specific receptors in human ESCs

Human ESCs did not express adiponectin at D3, D8 and D15 of cell decidualization. However, this adipokine was expressed in human adipose tissue, used as a positive control (Fig. 2A). The RT-qPCR results demonstrated that ESCs expressed *ADIPOR1* and *ADIPOR2*, whatever the decidualization status. Furthermore, the respective expression levels were 2.1- and 2.3-fold higher at D15 of cell culture, over D3 (Fig. 2B). Western blot analyses confirmed the presence of the two ADIPOR subtypes in human ESCs, at D3, D8 and D15 of cell decidualization. Human first-trimester placenta was used as a positive control (Fig. 2C).



### Figure 2

Adiponectin receptors are expressed in human ESCs. Human ESCs were cultured in DMEM/F12 medium supplemented with E2 and P4. (A) Total RNA was extracted after 3 days (D3), 8 days (D8) and 15 days (D15) of cell differentiation. Adiponectin, ADIPOR1 and ADIPOR2 mRNA expression levels were analyzed by RT-PCR with the primers listed in Table 1. PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis. The figure represents one representative of nine separate experiments. (B) ADIPOR1 and ADIPOR2 mRNA levels were quantified by RT-qPCR as described in Materials and methods section. The data are quoted as the mean±s.E.M. of nine separate experiments. (C) Western blot analysis of cell lysates (20µg) using anti-ADIPOR1 and anti-ADIPOR2 antibodies, as described in the Materials and methods section. The figure shows one representative of five separate experiments. \**P*<0.05; \*\**P*<0.01; NS: non-significant. ANOVA test.

http://jme.endocrinology-journals.org DOI: 10.1530/JME-17-0046 © 2017 The authors Printed in Great Britain



However, ESC treatment with adiponectin (25 ng/mL and 250 ng/mL) did not seem to affect *ADIPOR* expression in these cells (data not shown).

### Effect of adiponectin on human ESC decidualization

Prolactin, *IGFBP-1* and *CX-43* mRNA expressions and prolactin secretion were used as biochemical markers in order to study the differentiation of ESC into decidual cells. As shown in Fig. 3A, B and C, we observed all along the ESC decidualization process, a significant increasing prolactin, *IGFBP-1* and *CX-43* mRNA expressions, with a maximal expression at D15 (8.8-fold, 715.2-fold and 3.3-fold increase over D3, respectively). Likewise, we observed a rise in prolactin secretion between D1 and D15 of cell decidualization (118.4-fold) (Fig. 3D). These results validated our *in vitro* differentiation protocol and showed that ESCs are fully decidualized at D15.

Next, we studied adiponectin effect on decidualization. We did not observe an effect of adiponectin on prolactin mRNA expression, at D3, D8 and D15, for both doses tested (Fig. 3A). However, we showed a drastic decrease in prolactin secretion at D8, in the presence of 250 ng/mL adiponectin (-25%) and at D15, for the two doses tested (-27% at 25 ng/mL and -49% at 250 ng/mL) (Fig. 3D). In presence of adiponectin, we also observed a significant decrease in *IGFBP-1* mRNA expression (-72% at 25 ng/mL and -53% at 250 ng/mL) and *CX-43* mRNA expression (-41% at 25 ng/mL and -37% at 250 ng/mL) at D15 of cell culture only (Fig. 3B and C).



### Figure 3

Adiponectin limits ESC decidualization. Human ESCs were cultured in DMEM/F12 medium supplemented with E2 and P4, and exposed or not to adiponectin (25 ng/mL and 250 ng/mL) for 15 days. (A, B and C) Total RNA was extracted after 3 days (D3), 8 days (D8) and 15 days (D15) of cell differentiation. Prolactin, IGFBP-1 and connexin-43 mRNA levels were quantified by RT-qPCR, as described in the Materials and methods section. The data are quoted as the mean±s.E.M. of nine separate experiments. (A) Prolactin mRNA levels. (B) IGFBP-1 mRNA levels. (C) Connexin-43 mRNA levels. (D) Prolactin secretion into the endometrial supernatants was measured after 1 day (D1), 3 days (D3), 8 days (D8) and 15 days (D15) of cell differentiation, as described in the Materials and methods section. The data are quoted as the mean±s.E.M. of ten separate experiments. The control values were 16.75±3.07, 66.34±16.67, 571.35±157.07 and 2374.68±607.501U/g proteins for D1, D3, D8 and D15, respectively. \*P<0.01; \*\*\*P<0.001; \*\*\*P<0.001; NS: non-significant. (A) vs control situation (without adiponectin). Wilcoxon test. (B) vs D3; (C) vs D8; (D) vs D1. ANOVA test.

http://jme.endocrinology-journals.org DOI: 10.1530/JME-17-0046 © 2017 The authors Printed in Great Britain

# Research

F DUVAL and others

Adiponectin's roles during . human decidualization

**59**:3

### Involvement of adiponectin in the endometrial control of trophoblast invasion

In order to determine how adiponectin might be involved in the endometrial control of trophoblast invasion, we performed Matrigel Transwell invasion assays. We cultured the HTR-8/SVneo immortalized EVT cell line in the presence of CM collected from differentiating ESCs treated or not with adiponectin (25 ng/mL and 250 ng/mL) for 15 days (Fig. 4A). As shown in Fig. 4B, we observed that CM from ESCs treated with adiponectin significantly reduced the HTR-8/SVneo cell invasive capacities (-17% at 25 ng/mL and -32% at 250 ng/mL). In parallel, we performed Matrigel Transwell invasion assays with the HTR-8/SVneo cells in the presence of control medium supplemented or not with adiponectin (25 ng/mL and 250 ng/mL). As previously described by our laboratory, these experiments confirmed that adiponectin (250 ng/mL) enhanced trophoblast invasion (+23%) (Benaitreau et al. 2010a).



### Figure 4

Adiponectin improves the endometrial control of trophoblastic migration. (A) Transwell migration assays of HTR-8/SVneo cells were performed as described in the Materials and methods section. (B) HTR-8/ SVneo cells were suspended in the presence of conditioned medium (CM) from 15-day decidualized ESCs treated or not with adiponectin (25 ng/mL and 250 ng/mL) or in the presence of control medium, supplemented or not with adiponectin (25 ng/mL and 250 ng/mL). The data are quoted as the mean±s.E.M. of seven separate experiments. \*P<0.05; \*\*P<0.01; NS: non-significant. Wilcoxon test.

### Effect of adiponectin on endometrial TIMP mRNA expression

We next sought to specify the molecular mechanisms involved in adiponectin anti-invasive action. We focused on the mRNA expression of three invasion inhibitors, such as TIMP-1, TIMP-2, and TIMP-3, strongly expressed in the human endometrium. Using RT-qPCR, we found that TIMP-1 and TIMP-2 mRNA expression did not significantly change throughout ESC decidualization regardless of the presence or absence of adiponectin (data not shown). However, as shown in Fig. 5A, TIMP-3 mRNA expression increased significantly throughout the ESC decidualization process with a peak effect at D15 of cell culture (1.8-fold increase over D3). Furthermore, this increase was amplified by the presence of 25 ng/mL adiponectin (+117%, +81%, +69%, on D3, D8 and D15, respectively) and 250 ng/mL adiponectin (+122%, +100% and +125% at D3, D8 and D15, respectively).

### Effect of adiponectin on endometrial MMP activity

Zymography assays revealed two bands corresponding to the gelatinase activities of MMP-2 (72kDa) and MMP-9 (92kDa) in CM collected on D1, D8 and D15 of cell culture. Both gelatinases showed a higher activity at D8 and D15. An additional band of gelatinase activity (45 kDa) appeared in CM collected at D1 but had disappeared by D8 and D15 of cell culture (Fig. 5B). Figure 5C and D showed that adiponectin significantly decreased MMP-2 and MMP-9 activities at D8 (-19% for both MMPs) but only at the higher dose tested. At D15, however, we found that adiponectin downregulated MMP-2 activity (-11% at 25 ng/mL and -15% at 250 ng/mL) and MMP-9 activity (-28% at 25 ng/mL and -31% at 250 ng/mL).

### Effects of ADIPOR1 and ADIPOR2 knockdown in human ESCs

Considering the late effect of adiponectin on decidualization (significant at D15 of differentiation), we decided to knockdown ADIPOR1 and ADIPOR2 mRNA expressions with siRNA for the last 2 days of decidualization (from D13 to D15). We observed a significant decrease in ADIPOR1 and ADIPOR2 mRNA expression levels (-56 and -58%, respectively) after 48h of knockdown. This ADIPOR invalidation was confirmed using Western Blot analysis (Fig. 6).

Journal of Molecular Endocrinology

http://ime.endocrinology-iournals.org DOI: 10.1530/JME-17-0046

© 2017 The authors Printed in Great Britain

Research

f duval and others

Adiponectin's roles during human decidualization

**59**:3

293



### Figure 5

Adiponectin modifies endometrial TIMP expression and MMP activities. Human ESCs were cultured in DMEM/F12 medium supplemented with E2 and P4, and exposed or not to adiponectin (25 ng/mL and 250 ng/mL) for 15 days. (A) Total RNA was extracted after 3 days (D3), 8 days (D8) and 15 days (D15) of cell differentiation. The data are quoted as the mean±s.E.M. of ten separate experiments. (B) Activities of gelatinases in conditioned media (CM) from decidualized ESCs after 1 day (D1), 8 days (D8) and 15 days (D15) of cell differentiation were measured as described in the Materials and methods section. This figure shows one representative of seven separate experiments. (C) Quantification of the gelatin zymography results for the MMP-2 band. The data are quoted as the mean ± S.E.M. of seven separate experiments. (D) Quantification of the gelatin zymography results for the MMP-9 band. The data are quoted as the mean ± s.E.M. of seven separate experiments. \*P<0.05; \*\*P<0.01; NS: non-significant. (A) vs control situation (without adiponectin). Wilcoxon test. (B) vs D3; (C) vs D8. ANOVA test.

The partial suppression of *ADIPOR1* and *ADIPOR2* abolished the decrease of *CX-43* and *IGFBP-1* mRNA expressions observed in the presence of 250 ng/mL adiponectin (Fig. 7). In parallel, silencing the *ADIPOR1* or *ADIPOR2* genes suppressed adiponectin (250 ng/mL) effect on the endometrial control of trophoblast invasion (Fig. 8). These results were also observed when ADIPOR1 and ADIPOR2 were concomitantly invalidated (data not shown).

### Discussion

Effective embryo–maternal communication is the key for a successful pregnancy. Adiponectin is a cytokine described to induce the formation of a functional placenta (Benaitreau *et al.* 2010a,b). In this study, we sought to examine the role of adiponectin in maternal compartment by studying its effects on decidualization process and endometrial control of trophoblast invasion.



#### Figure 6

ADIPOR knockdown in human ESCs. Human ESCs were cultured in DMEM/F12 medium supplemented with E2 and P4 for 13 days. Next, ESCs were cultured for 2 days in the presence of siADIPOR1 (25 nM) or siADIPOR2 (25 nM) or siNS (10 nM). (A and B) Total RNA was extracted after treatment and then quantified by RT-qPCR, as described in the Materials and methods. (A) ADIPOR1 mRNA levels. (B) ADIPOR2 mRNA levels. The data are guoted as the mean ± s.E.M. of six separate experiments. (C and D) Western Blot analysis of cell lysates (20µg) using anti-ADIPOR1 and anti-ADIPOR2 antibodies, as described in the Materials and methods section. (C) ADIPOR1 protein levels were measured in transfected cells. (D) ADIPOR2 protein levels were measured in transfected cells. The figure represents one representative of four experiments. \*\*P<0.01. Wilcoxon test.

http://jme.endocrinology-journals.org DOI: 10.1530/JME-17-0046 © 2017 The authors Printed in Great Britain

# AUTHOR COPY ONLY Research F DUVAL and others Adiponectin's roles during

A Connexin-43 mRNA / reference genes mRNA NS 120 100 (% of control) 80 60 40 20 ٥ siNS siADIPOR1 siADIPOR2 В NS IGFBP-1 mRNA / reference genes mRNA NS 120 100 (% of control) 80 60 40 20 n siNS siADIPOR1 siADIPOR2 Adiponectin 0 ng/ml Adiponectin 250 ng/ml

### Figure 7

ADIPOR invalidation suppress anti-differentiative adiponectin effect in human ESCs. Human ESCs were cultured in DMEM/F12 medium supplemented with E2 and P4 for 13 days. Next, ESCs were cultured for 2 days in the presence of siADIPOR1 (25nM) or siADIPOR2 (25nM) or siNS (10nM). ESCs transfected with siADIPOR1, siADIPOR2 or siNS were exposed or not to adiponectin (250ng/mL). Total RNA was extracted after treatment and then quantified by RT-qPCR, as described in the Materials and methods section. The data are quoted as the mean±s.E.M. of six separate experiments. (A) Connexin-43 mRNA levels were measured in transfected cells. (B) IGFBP-1 mRNA levels were measured in transfected cells. \**P*<0.05; NS: non-significant. Wilcoxon test.

Firstly, we attempted to determine whether human ESCs transcribe the *ADIPOR1* and *ADIPOR2* genes. Our results reveal that isolated human ESCs do indeed express these two receptors and strongly suggest that the endometrium is a target tissue for this adipokine. We also observed that *ADIPOR1* and *ADIPOR2* mRNA levels increased moderately throughout the *in vitro* endometrial decidualization (with a 2-fold increase between D0 and D15 of decidualization). Our results differ quantitatively from those observed by Gamundi-Segura and coworkers who observed a 10-fold increase in *ADIPOR* mRNA expression in ESCs during decidualization (Gamundi-Segura *et al.* 2015). As the endometrium undergoes major remodeling over the ovarian cycle, this discrepancy might be due to the time point at which the biopsy was performed

http://jme.endocrinology-journals.org DOI: 10.1530/JME-17-0046 © 2017 The authors Printed in Great Britain



**59**:3

294

#### Figure 8

. human decidualization

ADIPOR invalidation suppress anti-invasive adiponectin effect in human ESCs. HTR-8/SVneo cells were suspended in the presence of conditioned medium (CM) from ESCs transfected with siADIPOR1, siADIPOR2 or siNS, supplemented or not with adiponectin (250 ng/mL) to perform Transwell invasion assays. The data are quoted as the mean  $\pm$  s.E.M. of six separate experiments. \**P*<0.05; NS: non-significant. Wilcoxon test.

(window of implantation in our study and oocyte pickup in the study by Gamundi-Segura and coworkers). Furthermore, and in accordance with a previous study in human ESCs, we did not observe any regulation of ADIPOR1 or ADIPOR2 by adiponectin in these cells (Bohlouli et al. 2013). We also found that adiponectin did not seem to be produced by isolated human ESCs under our experimental conditions. This result contrasts with previous publications, including ours (Takemura et al. 2006, Dos Santos et al. 2012). However, these earlier studies were performed with endometrial tissue that contains various cell types (stromal cells, epithelial cells, blood vessels, etc.). Detection of adiponectin in endometrial tissue might well have been due to the presence of peripheral blood. Experiments to establish whether isolated endometrial epithelial cells express adiponectin are currently underway in our laboratory.

Secondly, we assessed ESC decidualization by measuring the expression of decidualization markers, as prolactin, IGFBP-1 and connexin-43. We observed a time-dependent increased expression of these three markers (between D3 and D15), in the presence of the differentiation medium, indicating that ESCs are fully differentiated at D15. This result is commonly observed for in vitro ESC decidualization in the presence of E2 and P4 (Kasahara *et al.* 2001, Godbole *et al.* 2011). We also studied adiponectin effect on ESC decidualization. To this end, we used subphysiological doses of recombinant human adiponectin (25 ng/mL and 250 ng/mL), which are much lower than those observed in the human circulation. This recombinant human adiponectin effectively mainly

Published by Bioscientifica Ltd.

F DUVAL and others

Adiponectin's roles during human decidualization 295

**59**:3

comprises the high-molecular-weight form (Bub et al. 2006), considered to be the active isoform (Kobayashi et al. 2004). Moreover, adiponectin is commonly used at these concentrations for in vitro experiments with various tissue and cell types (Bråkenhielm et al. 2004, Dos Santos et al. 2008, Duval et al. 2016). Our results clearly show that adiponectin negatively controls biochemical ESC decidualization in a dose-independent manner. We effectively observed a significant decrease of prolactin secretion in ESCs treated with adiponectin. There was no effect on prolactin mRNA expression. This lack of correspondence between RNA and protein levels is not surprising and has been already described (Salari et al. 2012, Beileke et al. 2015). One study specifically evidenced the mismatch between the prolactin mRNA expression and hormone release (Castaño et al. 1997).

Research

Thirdly, we demonstrated that adiponectin connexin-43 downregulates IGFBP-1 and mRNA expression levels. These effects were mainly observed when ESCs were fully differentiated (after 15 days of decidualization). As levels of ADIPOR mRNA doubled between D0 and D15 of decidualization, this observation might explain the delayed, negative effect of adiponectin on decidualization. Taken as a whole, these data suggest that like hCG, leptin and interleukin-1, adiponectin could be a new regulator of human ESC decidualization (Kariya et al. 1991, Kasahara et al. 2001, Tanaka et al. 2003).

As one of the major roles of decidual cells is the control of trophoblast invasion (Godbole et al. 2011, Sharma et al. 2016), we next looked at whether adiponectin could modify the ability of decidualized ESCs to regulate this process. Therefore, we used Transwell assays to estimate the trophoblast HTR-8/SVneo cell line invasive capacities when seeded with CM from ESCs treated or not with adiponectin. Our results clearly demonstrate that CM from ESC cultured in the presence of adiponectin significantly decreased trophoblastic cell ability to invade Matrigel. In order to gain more information at molecular level, we next investigated adiponectin effect on the MMP/ TIMP balance in human ESCs. Our data demonstrate that adiponectin significantly and specifically upregulated TIMP-3 mRNA expression and, conversely, reduced MMP-2,-9 activities in ESCs. Thus, it seems that in human endometrium, adiponectin can modulate, at least in part, ECM remodeling via regulation of the MMP-2,-9/TIMP-3 balance. Adiponectin effects on human ESCs were once again dose independent, but is not surprising, since the majority of in vitro studies performed in various cell types such as placental cells, did not show a dose-response effect for adiponectin (Benaitreau *et al.* 2009, Duval *et al.* 2016). Taken as a whole, these data suggest that adiponectin induces the production of endometrial factors, which could limit trophoblast invasion. At present, it is difficult to precise whether the secretion of endometrial factors is directly controlled by adiponectin, or indirectly *via* the induced production of hormones or cytokines. A recent study effectively demonstrated that TNF- $\alpha$  facilitates EVT invasion *in vitro* by regulating the MMP/TIMP balance in human ESCs (Haider & Knöfler 2009). Thus, endometrial TNF- $\alpha$  signal could be modified by adiponectin, as described in macrophages and in adipocytes (Tsatsanis *et al.* 2005, Greenberg & Obin 2006). Additional experiments will be needed to clarify this hypothesis.

In order to confirm the specific involvement of ADIPOR1 and ADIPOR2 in adiponectin regulation of ESC decidualization and the control of trophoblast invasion, we silenced ADIPORs in ESCs. We found that *ADIPOR1* and *ADIPOR2* knockdown (separately or concomitantly) suppressed adiponectin anti-differentiative and anti-invasive effects in human ESCs. These results clearly demonstrated the critical involvement of the ADIPORs in adiponectin control of ESC functions.

Lastly, we also attempted to determine whether or not the human ESC decidualization status is associated with the cell ability to control ECM remodeling. We clearly demonstrated that TIMP expression and MMP activities are closely related to ESC decidualization status. Indeed, we confirmed that TIMP-3 mRNA expression significantly rose throughout decidualization, as described by Zhang and Salamonsen (Zhang & Salamonsen 1997). We also found that non-decidualized ESCs secrete an active MMP, which might be MMP-3. Indeed, MMP-3 is a 45 kDa protein able to digest gelatin. However, the putative MMP-3 activity falls during decidualization. With regard to MMP-9, and more especially MMP-2, which appears to be the most abundantly produced gelatinase in ESCs, we observed an upregulation of their activities during decidualization. These results confirmed that ECM remodeling occurs during ESC differentiation in order to maintain endometrial integrity, which is essential for embryo implantation.

Interestingly, we noted that although adiponectin enhances the MMP/TIMP ratio in human trophoblastic cells, and thus, promotes invasion (Benaitreau *et al.* 2010*a*); this adipokine decreases the MMP/TIMP ratio in human ESCs during cell decidualization. This would limit cell migration and consequently avoid excessive invasion. Taken as a whole, these data strongly suggest

http://jme.endocrinology-journals.org DOI: 10.1530/JME-17-0046 © 2017 The authors Printed in Great Britain

Research

F DUVAL and others

Adiponectin's roles during human decidualization

**59**:3

that the adiponectin system has a critical role in the establishment of embryo implantation by maintaining the balance of pro-invasive and anti-invasive signals in placenta and endometrium, respectively. In conclusion, it should be noted that dysregulation of the placental invasive potential is associated with several pregnancy pathologies, as spontaneous miscarriages, preeclampsia, intrauterine growth restriction (reduced trophoblast invasion), placenta accreta and choriocarcinoma (excessive trophoblast invasion) (Lala *et al.* 2002, Anin *et al.* 2004, Ball *et al.* 2006, Kadyrov *et al.* 2006). Hence, our results suggest that adiponectin, through dual control in trophoblast and decidual cells, could have a causative role in the appearance of these pathologies by modulating the invasive capacities.

#### **Declaration of interest**

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

### Funding

This work was funded by the Institut de Recherche en Santé de la Femme, based at the UFR des Sciences de la Santé, University of Versailles – Saint Quentin en Yvelines.

### Author contribution statement

F D and M N D designed the experiments. F D and H M performed the experiments. F D and M N D analyzed the data. F D, M N D and E D S wrote the manuscript. N S B provided human endometrial biopsies for experiments. V S performed automated quantifications. F V participated in critical revision of the manuscript.

### Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the staff at the Department of Gynecology and Obstetrics at CHI de Poissy-Saint-Germain, for kindly human endometrial biopsies available. They thank Guillaume Groffe for technical support. Immunofluorescence image acquisition and analysis were performed at the CYMAGES facility, supported by the Saint-Quentinen-Yvelines Urban Community and the University of Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines.

### References

Anin SA, Vince G & Quenby S 2004 Trophoblast invasion. *Human Fertility* **7** 169–174. (doi:10.1080/14647270400006911)

Ball E, Bulmer JN, Ayis S, Lyall F & Robson SC 2006 Late sporadic miscarriage is associated with abnormalities in spiral artery transformation and trophoblast invasion. *Journal of Pathology* 208 535–542. (doi:10.1002/path.1927)

Beileke S, Claassen H, Wagner W, Matthies C, Ruf C, Hartmann A, Garreis F, Paulsen F, Schicht M & Bräuer L 2015 Expression and

http://jme.endocrinology-journals.org DOI: 10.1530/JME-17-0046 © 2017 The authors Printed in Great Britain localization of lung surfactant proteins in human testis. *PLoS ONE* **10** e0143058. (doi:10.1371/journal.pone.0143058)

- Benaitreau D, Dieudonné M-N, Dos Santos E, Leneveu M-C, de Mazancourt P & Pecquery R 2009 Antiproliferative effects of adiponectin on human trophoblastic cell lines JEG-3 and BeWo. *Biology of Reproduction* **80** 1107–1114. (doi:10.1095/ biolreprod.108.070573)
- Benaitreau D, Dos Santos E, Leneveu M-C, Alfaidy N, Feige J-J, de Mazancourt P, Pecquery R & Dieudonné M-N 2010*a* Effects of adiponectin on human trophoblast invasion. *Journal of Endocrinology* **207** 45–53. (doi:10.1677/JOE-10-0170)
- Benaitreau D, Dos Santos E, Leneveu M-C, De Mazancourt P, Pecquery R & Dieudonné M-N 2010b Adiponectin promotes syncytialisation of BeWo cell line and primary trophoblast cells. *Reproductive Biology and Endocrinology* 8 128. (doi:10.1186/1477-7827-8-128)
- Bohlouli S, Khazaei M, Teshfam M & Hassanpour H 2013 Adiponectin effect on the viability of human endometrial stromal cells and mRNA expression of adiponectin receptors. *International Journal of Fertility and Sterility* **7** 43–48.
- Bråkenhielm E, Veitonmäki N, Cao R, Kihara S, Matsuzawa Y, Zhivotovsky B, Funahashi T & Cao Y 2004 Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis. *PNAS* **101** 2476–2481. (doi:10.1073/ pnas.0308671100)
- Brar AK, Frank GR, Richards RG, Meyer AJ, Kessler CA, Cedars MI, Klein DJ & Handwerger S 1995 Laminin decreases PRL and IGFBP-1 expression during in vitro decidualization of human endometrial stromal cells. *Journal of Cellular Physiology* **163** 30–37. (doi:10.1002/jcp.1041630105)
- Bub JD, Miyazaki T & Iwamoto Y 2006 Adiponectin as a growth inhibitor in prostate cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **340** 1158–1166. (doi:10.1016/j.bbrc.2005.12.103)
- Burrows TD, King A & Loke YW 1996 Trophoblast migration during human placental implantation. *Human Reproduction Update* 2 307–321. (doi:10.1093/humupd/2.4.307)
- Campos DB, Palin M-F, Bordignon V & Murphy BD 2008 The 'beneficial' adipokines in reproduction and fertility. *International Journal of Obesity* **32** 223–231. (doi:10.1038/sj.ijo.0803719)
- Castaño JP, Faught WJ, Glavé EE, Russell BS & Frawley LS 1997 Discordance of prolactin gene transcription, mRNA storage, and hormone release in individual mammotropes. *American Journal of Physiology* **272** E390–E396.
- Diedrich K, Fauser BCJM, Devroey P & Griesinger G 2007 The role of the endometrium and embryo in human implantation. *Human Reproduction Update* **13** 365–377. (doi:10.1093/humupd/dmm011)
- Dieudonne M-N, Bussiere M, Dos Santos E, Leneveu M-C, Giudicelli Y & Pecquery R 2006 Adiponectin mediates antiproliferative and apoptotic responses in human MCF7 breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **345** 271–279. (doi:10.1016/j.bbrc.2006.04.076)
- Dos Santos E, Benaitreau D, Dieudonne M-N, Leneveu M-C, Serazin V, Giudicelli Y & Pecquery R 2008 Adiponectin mediates an antiproliferative response in human MDA-MB 231 breast cancer cells. *Oncology Reports* **20** 971–977. (doi:10.3892/or.00000098)
- Dos Santos E, Serazin V, Morvan C, Torre A, Wainer R, De Mazancourt P & Dieudonné MN 2012 Adiponectin and leptin systems in human endometrium during window of implantation. *Fertility and Sterility* **97** 771–8.e1. (doi:10.1016/j.fertnstert.2011.12.042)
- Duval F, Dos Santos E, Poidatz D, Sérazin V, Gronier H, Vialard F & Dieudonné M-N 2016 Adiponectin inhibits nutrient transporters and promotes apoptosis in human villous cytotrophoblasts: involvement in the control of fetal growth. *Biology of Reproduction.* (doi:10.1095/biolreprod.115.134544)
- Estella C, Herrer I, Atkinson SP, Quiñ onero A, Martínez S, Pellicer A, Simó C & Wang H 2012 Inhibition of histone deacetylase activity in human endometrial stromal cells promotes extracellular matrix

Research

F DUVAL and others

Adiponectin's roles during human decidualization **59**:3

remodelling and limits embryo invasion. *PLoS ONE* **7** e30508. (doi:10.1371/journal.pone.0030508)

- Gamundi-Segura S, Serna J, Oehninger S, Horcajadas JA & Arbones-Mainar JM 2015 Effects of adipocyte-secreted factors on decidualized endometrial cells: modulation of endometrial receptivity in vitro. *Journal of Physiology and Biochemistry* **71** 537–546. (doi:10.1007/s13105-015-0393-0)
- Godbole G, Suman P, Gupta SK & Modi D 2011 Decidualized endometrial stromal cell derived factors promote trophoblast invasion. *Fertility and Sterility* **95** 1278–1283. (doi:10.1016/j.fertnstert.2010.09.045)
- Gonzalez RR, Palomino A, Boric A, Vega M & Devoto L 1999 A quantitative evaluation of alpha1, alpha4, alphaV and beta3 endometrial integrins of fertile and unexplained infertile women during the menstrual cycle. A flow cytometric appraisal. *Human Reproduction* **14** 2485–2492. (doi:10.1093/humrep/14.10.2485)
- Greenberg AS & Obin MS 2006 Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *American Journal of Clinical Nutrition* **83** 461S–465S.
- Grewal S, Carver JG, Ridley AJ & Mardon HJ 2008 Implantation of the human embryo requires Rac1-dependent endometrial stromal cell migration. PNAS 105 16189–16194. (doi:10.1073/pnas.0806219105)
- Haider S & Knöfler M 2009 Human tumour necrosis factor: physiological and pathological roles in placenta and endometrium. *Placenta* **30** 111–123. (doi:10.1016/j.placenta.2008.10.012)
- Huppertz B, Kertschanska S, Demir AY, Frank HG & Kaufmann P 1998 Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases (MMP), their substrates, and their inhibitors (TIMP) during trophoblast invasion in the human placenta. *Cell and Tissue Research* **291** 133–148. (doi:10.1007/s004410050987)
- Kadyrov M, Kingdom JCP & Huppertz B 2006 Divergent trophoblast invasion and apoptosis in placental bed spiral arteries from pregnancies complicated by maternal anemia and early-onset preeclampsia/ intrauterine growth restriction. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **194** 557–563. (doi:10.1016/j.ajog.2005.07.035)
- Kariya M, Kanzaki H, Takakura K, Imai K, Okamoto N, Emi N, Kariya Y & Mori T 1991 Interleukin-1 inhibits in vitro decidualization of human endometrial stromal cells. *Journal of Clinical Endocrinology* and Metabolism **73** 1170–1174. (doi:10.1210/jcem-73-6-1170)
- Kasahara K, Takakura K, Takebayashi K, Kimura F, Nakanishi K & Noda Y 2001 The role of human chorionic gonadotropin on decidualization of endometrial stromal cells in vitro. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **86** 1281–1286. (doi:10.1210/jcem.86.3.7281)
- Kern PA, Di Gregorio GB, Lu T, Rassouli N & Ranganathan G 2003 Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression. *Diabetes* **52** 1779–1785. (doi:10.2337/diabetes.52.7.1779)
- Kobayashi H, Ouchi N, Kihara S, Walsh K, Kumada M, Abe Y, Funahashi T & Matsuzawa Y 2004 Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin. *Circulation Research* **94** e27–e31. (doi:10.1161/01. RES.0000119921.86460.37)
- Lala PK, Lee BP, Xu G & Chakraborty C 2002 Human placental trophoblast as an in vitro model for tumor progression. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **80** 142–149. (doi:10.1139/y02-006)
- Lunghi L, Ferretti ME, Medici S, Biondi C & Vesce F 2007 Control of human trophoblast function. *Reproductive Biology and Endocrinology* 5 6. (doi:10.1186/1477-7827-5-6)
- Machinal-Quélin F, Dieudonné MN, Leneveu MC, Pecquery R & Giudicelli Y 2002 Proadipogenic effect of leptin on rat preadipocytes in vitro: activation of MAPK and STAT3 signaling pathways. *American Journal of Physiology* 282 C853–C863. (doi:10.1152/ajpcell.00331.2001)

- Merviel P, Degeorges A, Salat-Baroux J & Calvo F 1995 Normal human endometrial cells in culture: characterization and immortalization of epithelial and stromal cells by SV 40 large T antigen. *Biology of the Cell* **84** 187–193. (doi:10.1016/0248-4900(96)89428-7)
- Nissi R, Talvensaari-Mattila A, Kotila V, Niinimäki M, Järvelä I, Turpeenniemi-Hujanen T, Staun-Ram E, Goldman S, Gabarin D, Shalev E, *et al.* 2013 Circulating matrix metalloproteinase MMP-9 and MMP-2/TIMP-2 complex are associated with spontaneous early pregnancy failure. *Reproductive Biology and Endocrinology* **11** 2. (doi:10.1186/1477-7827-11-2)
- Salari R, Wojtowicz D, Zheng J, Levens D, Pilpel Y, Przytycka TM, Elowitz M, Levine A, Siggia E, Swain P, et al. 2012 Teasing apart translational and transcriptional components of stochastic variations in eukaryotic gene expression. PLoS Computational Biology 8 e1002644. (doi:10.1371/journal.pcbi.1002644)
- Sharma S, Godbole G & Modi D 2016 Decidual control of trophoblast invasion. American Journal of Reproductive Immunology 75 341–350. (doi:10.1111/aji.12466)
- Singh M, Chaudhry P & Asselin E 2011 Bridging endometrial receptivity and implantation: network of hormones, cytokines, and growth factors. *Journal of Endocrinology* **210** 5–14. (doi:10.1530/JOE-10-0461)
- Staun-Ram E, Goldman S, Gabarin D & Shalev E 2004 Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2 59. (doi:10.1186/1477-7827-2-59)
- Takemura Y, Osuga Y, Yamauchi T, Kobayashi M, Harada M, Hirata T, Morimoto C, Hirota Y, Yoshino O, Koga K, et al. 2006 Expression of adiponectin receptors and its possible implication in the human endometrium. Endocrinology 147 3203–3210. (doi:10.1210/en.2005-1510)
- Tanaka T, Utsunomiya T, Bai T, Nakajima S & Umesaki N 2003 Leptin inhibits decidualization and enhances cell viability of normal human endometrial stromal cells. *International Journal of Molecular Medicine* **12** 95–98. (doi:10.3892/ijmm.12.1.95)
- Tapia-Pizarro A, Argandoña F, Palomino WA & Devoto L 2013 Human chorionic gonadotropin (hCG) modulation of TIMP1 secretion by human endometrial stromal cells facilitates extravillous trophoblast invasion in vitro. *Human Reproduction* 28 2215–2227. (doi:10.1093/ humrep/det136)
- Tsatsanis C, Zacharioudaki V, Androulidaki A, Dermitzaki E, Charalampopoulos I, Minas V, Gravanis A & Margioris AN 2005 Adiponectin induces TNF-α and IL-6 in macrophages and promotes tolerance to itself and other pro-inflammatory stimuli. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **335** 1254–1263. (doi:10.1016/j.bbrc.2005.07.197)
- Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, *et al.* 2003*a* Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* **423** 762–769. (doi:10.1038/nature01705)
- Yamauchi T, Hara K, Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Froguel P, Nagai R & Kadowaki T 2003b Dual roles of adiponectin/Acrp30 in vivo as an anti-diabetic and anti-atherogenic adipokine. *Current Drug Targets* **3** 243–254. (doi:10.2174/1568008033340090)
- Yu J, Wu J, Bagchi IC, Bagchi MK, Sidell N & Taylor RN 2011 Disruption of gap junctions reduces biomarkers of decidualization and angiogenesis and increases inflammatory mediators in human endometrial stromal cell cultures. *Molecular and Cellular Endocrinology* 344 25–34. (doi:10.1016/j.mce.2011.04.011)
- Zhang J & Salamonsen LA 1997 Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1, -2 and -3 in human endometrium during the menstrual cycle. *Molecular Human Reproduction* **3** 735–741. (doi:10.1093/ molehr/3.9.735)

Received in final form 12 July 2017 Accepted 21 July 2017 Accepted Preprint published online 21 July 2017

http://jme.endocrinology-journals.org DOI: 10.1530/JME-17-0046 © 2017 The authors Printed in Great Britain

### **A**DIPOKINES ET FAUSSES-COUCHES SPONTANÉES À RÉPÉTITION

## UTILISATION DE L'ADIPONECTINE ET DE LA LEPTINE COMME POTENTIELS BIOMARQUEURS DE CETTE PATHOLOGIE

### article 2

# Are leptin and adiponectin involved in recurrent pregnancy loss?

Valérie Sérazin, **Fabien Duval**, Robert Wainer, Célia Ravel, François Vialard, Denise Molina-Gomes, Marie-Noëlle Dieudonné, Esther Dos Santos

THE JOURNAL OF OBSTETRICS AND GYNAECOLOGY RESEARCH (2017)

### Introduction

La fausse-couche ou avortement spontané est la complication la plus fréquente de la grossesse (15 à 20% des femmes enceintes). Selon la définition de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), une fausse-couche correspond à l'expulsion d'un embryon ou d'un fœtus avant la 20<sup>ème</sup> semaine de grossesse ou ayant un poids inférieur à 500 grammes. Les fausses-couches spontanées sont dites « à répétition » si au moins trois interruptions de grossesse successives sont survenues au cours du premier trimestre. Environ 1% des couples pris en charge en assistance médicale à la procréation (AMP) seraient actuellement concernés par cette pathologie. Le risque augmente avec l'âge et le nombre de fausses-couches antérieures.

Les fausses-couches spontanée à répétition (FCSR) peuvent avoir plusieurs origines. Il existe des causes chromosomiques (translocations, inversions...), génétiques (mutations), anatomiques (utérus cloisonné, synéchies utérines...), immunologiques (maladies auto-immunes), infectieuses et endocriniennes (dysthyroïdies, progestéronémie anormale...). Cependant, dans la majorité des cas, la cause demeure idiopathique. La découverte de nouveaux biomarqueurs est donc nécessaire pour expliquer cette pathologie et ainsi améliorer la prise en charge des femmes présentant des FCSR. Parmi ces biomarqueurs potentiels figurent deux adipokines : la leptine et l'adiponectine.

La leptine est le produit du gène *ob* situé sur le chromosome 7. Les taux de leptine circulants sont proportionnels à l'indice de masse corporel (IMC) et à la masse adipeuse. Décrite comme l'hormone de la satiété, la leptine semble également jouer un rôle crucial dans la fonction de reproduction. En effet, des souris n'exprimant pas le gène *ob* sont stériles. Cependant leur fertilité peut être restaurée par l'injection de leptine recombinante. En outre, la leptine participe activement au développement embryonnaire pré-implantatoire chez la souris, ainsi qu'au déclenchement de la puberté, par son action sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. A l'interface fœto-maternelle, la leptine est sécrétée par les cellules de l'endomètre et par les cellules placentaires. Le récepteur Ob-R, par l'intermédiaire duquel la leptine exerce son action, est également exprimé par ces deux types cellulaires suggérant que l'endomètre et le placenta sont des tissus cibles de cette adipokine. Au cours de la grossesse, les taux sériques maternels de leptine augmentent progressivement jusqu'à la 28<sup>ème</sup> semaine de grossesse et

restent relativement constants jusqu'à l'accouchement, où ils chutent brusquement. Ainsi, la leptine est considérée comme une hormone placentaire.

L'adiponectine quant à elle, est produite par le gène apM1 situé sur le chromosome 3. Elle est présente en très grande concentration dans la circulation sanguine (5 à 15 µg/ml selon les individus, soit 0,01% des protéines plasmatiques totales). A l'inverse de la leptine et de toutes les autres protéines de la famille des adipokines, la concentration d'adiponectine circulante est inversement proportionnelle à la masse grasse. Outre ces effets anti-inflammatoires, anti-angiogéniques et anti-athérogènes, l'adiponectine semble être impliquée dans la régulation de la fonction de reproduction, notamment au cours de la grossesse, bien que les taux d'adiponectine plasmatique chez la mère ne varient pas au cours de la gestation. En effet, les cellules placentaires n'expriment pas l'adiponectine. Cependant, l'adiponectine participe à la mise en place d'un placenta fonctionnel en favorisant la différenciation de la lignée villeuse et en induisant l'acquisition d'un phénotype invasif par les cellules extravilleuses. Enfin, le placenta et l'endomètre expriment tous deux les récepteurs spécifiques de l'adiponectine, ADIPOR1 et ADIPOR2, suggérant qu'il s'agit de deux tissus cibles de cette cytokine.

Des concentrations maternelles anormales d'adiponectine et de leptine ont été décrites dans la survenue de pathologies de la reproduction. Ainsi, une hyperleptinémie et une hypoadiponectinémie chez la femme, sont associées à la survenue du syndrome des ovaires polykystiques, de l'endométriose et du diabète gestationnel. De la même façon, certains polymorphismes des gènes codant l'adiponectine -276 (G/T) et 45 (T/G)) et la leptine (-2548 G/A) sont associés à la survenue de pathologies comme la pré-éclampsie et le diabète gestationnel.

Dans ce contexte, nous avons souhaité étudier si la survenue de FCSR est associée à une dérégulation des taux plasmatiques de leptine et d'adiponectine chez la femme et/ou à la présence de polymorphismes des gènes codant ces deux adipokines.

### Matériels et Méthodes

**Population d'étude.** Cette étude a été conduite au CHIPS qui est classé « Centre de Référence des FCSR » par le Ministère de la Santé. Dix-neuf patientes fertiles constituent le groupe « Contrôle ». Il

• 184 •

s'agit de donneuses d'ovocytes qui n'ont connu aucune complication au cours de leur grossesse antérieure. En parallèle, 126 patientes ont été classées dans le groupe « FCSR ». Ces femmes ont subi au moins trois avortements spontanés au cours du premier trimestre de grossesse (entre 8 et 14 semaines de grossesse) et n'ont jamais connu de grossesse à terme. La cause de ces FCSR n'a pu être établie. Les anomalies anatomiques, chromosomiques, hormonales, infectieuses, immunologiques ou de coagulation ont toutes été écartées. Les prélèvements sanguins ont été réalisés au cours de la fenêtre implantatoire.

Mesure des taux de leptine et d'adiponectine circulants. Les dosages de la leptine et de l'adiponectine ont été réalisés par la technique immunoenzymatique du test ELISA « en sandwich ». Le seuil minimal de détection de chaque kit était respectivement de 0,2 ng/ml pour la leptine et de 0,6 ng/ml pour l'adiponectine. Les taux sériques de ces deux adipokines ont été étudiés au sein de 60 patientes du groupe « FCSR » et des 19 femmes du groupe « Contrôle ». Ces deux populations présentent un âge similaire. Ainsi, l'âge moyen est de 34,0 ± 0,5 ans pour le groupe « FCSR » et 31,7 ± 0,6 ans pour le groupe « Contrôle ». De même, il n'existe pas de différence significative concernant l'IMC de ces femmes (24,4 ± 0,6 kg/m<sup>2</sup> pour le groupe « FCSR » et 24,2 ± 1,9 kg/m<sup>2</sup> pour le groupe « Contrôle »).

**Etude des polymorphismes des gènes de la leptine et de l'adiponectine.** Afin d'étudier la corrélation entre la survenue de FCSR et différents polymorphismes de la leptine et de l'adiponectine, nous avons choisi la technique de PCR allèle spécifique. L'objectif ici, est d'utiliser deux sondes, couplés à des fluorochromes différents (VIC ou FAM) reconnaissant chacune un nucléotide différent. Une fluorescence spécifique du polymorphisme présent dans l'ADN est observée à la fin du dernier cycle de PCR. L'analyse de cette fluorescence nous permet de définir si la patiente est homozygote pour l'allèle 1 (fluorescence VIC), homozygote pour l'allèle 2 (fluorescence FAM), ou hétérozygote (mesure des deux types de fluorescence). Ainsi, nous avons mesuré la fréquence allélique de chaque polymorphisme au sein des 126 femmes constituant la population « FCSR » que nous avons comparé à la fréquence allélique observée au sein de la population européenne (population de référence).

### Résultats et Conclusions

Les taux sériques de leptine mesurés chez les femmes souffrant de FCSR ( $17,60 \pm 1,86$  ng/ml) sont significativement plus élevé que ceux observés chez les femmes fertiles ( $12,11 \pm 2,04$  ng/ml) (p-value < 0,03). La leptinémie des patientes du groupe « FCSR » est identique à celle des patiente du groupe « Contrôle ».

La mesure de la fréquence allélique de l'allèle sauvage (G) et de l'allèle muté (A) du gène de la leptine met en évidence une légère distinction entre le groupe « FCSR » et la population européenne. En effet, la fréquence de l'allèle muté est de 37,7% au sein du groupe de femmes souffrant de fausses-couches, alors qu'il est de 44,0% au sein de la population européenne de référence. Cependant, l'analyse statistique ne permet pas de confirmer ces observations (p-value = 0,15). Les fréquences alléliques du polymorphisme -2548 (G/A) de la leptine au sein du groupe « FCSR » sont identiques aux fréquences alléliques observées au sein de la population européenne.

Concernant les taux sériques d'adiponectine chez ces deux groupes de femmes, nous observons une augmentation hautement significative (p-value < 0,001) de l'adiponectinémie au sein du groupe « FCSR » (7,15  $\pm$  0,61 µg/ml pour le groupe « Contrôle » et 10,24  $\pm$  0,06 µg/ml pour le groupe « FCSR »). L'adiponectinémie des patientes du groupe « FCSR » est augmentée par comparaison aux patientes du groupe « Contrôle ».

L'étude des polymorphismes du gène de l'adiponectine ne montre aucune différence des fréquences alléliques au sein des deux populations. En effet, elle est de 28,7% chez les femmes « FCSR » et 28,0% dans la population européenne pour l'allèle muté (T) du polymorphisme 276 (G/T). Concernant le polymorphisme 45 (T/G), la fréquence de l'allèle muté (G) est de 14,3% dans le groupe « FCSR » et 13,0% dans la population de référence. Les fréquences alléliques des deux polymorphismes de l'adiponectine ne présentent aucune variation par rapport à la population européenne de référence.

### Discussion

L'objectif de cette étude est d'établir une éventuelle corrélation entre les taux sériques de deux adipokines (leptine et adiponectine) et/ou les polymorphismes des gènes codant ces deux protéines avec la survenue de FCSR.

Nos résultats démontrent une corrélation entre les taux sériques de leptine et d'adiponectine et la survenue de FCSR. En effet, cette pathologie semble être associée à une hyperleptinémie et une hyperadiponectinémie. De nombreuses études suggèrent que le ratio leptine/adiponectine est un biomarqueur pertinent lors du diagnostic de nombreuses pathologies telles que l'insulino-résistance, l'athérosclérose, le syndrome métabolique, les maladies cardiovasculaires, ou encore le syndrome des ovaires polykystiques. Nos résultats suggèrent que le ratio leptine/adiponectine est augmenté lors de la survenue de FCSR. Cependant nous n'avons pas pu confirmer cette tendance de manière statistique.

L'étude d'un polymorphisme du gène de la leptine démontre une légère différence entre les fréquences alléliques observées chez des femmes souffrant de FCSR et une population de femmes européennes de référence. Afin de démontrer statistiquement cette divergence, il serait pertinent d'augmenter le nombre de sujets de cette étude, et de créer un groupe « Contrôle » afin de comparer les femmes « FCSR » avec une population similaire (notamment, concernant l'âge et l'IMC). Quant à l'adiponectine, l'étude génétique ne démontre aucune différence entre les populations « FCSR » et de référence.

Il pourrait être intéressant d'étudier les polymorphismes des récepteurs de l'adiponectine et/ou de la leptine. En effet, plusieurs études ont démontré que le polymorphisme 223 (A/G) du récepteur de la leptine est associé à la survenue de la pré-éclampsie.

En conclusion, nos résultats semblent démontrer qu'une augmentation des taux d'adiponectine chez la femme augmenterait le risque de FCSR. Cette pathologie est liée en partie à un défaut d'invasion trophoblastique et/ou à une décidualisation déficiente. Ces résultats sont donc en accord avec nos données *in vitro*, qui montrent un effet inhibiteur de l'adiponectine sur la décidualisation et l'invasion trophoblastique dans l'endomètre (article 1).

### Are leptin and adiponectin involved in recurrent pregnancy loss?

Valérie SERAZIN<sup>1,2</sup>, Fabien DUVAL<sup>1</sup>, Robert WAINER<sup>1</sup>, Célia RAVEL<sup>3</sup>, François VIALARD<sup>1,2</sup>, Denise MOLINA-GOMES<sup>1</sup>, Marie-Noëlle DIEUDONNE<sup>1</sup> and Esther DOS SANTOS<sup>1,2\*</sup>

1: EA 7404, Gamètes - Implantation - Gestation, 2 avenue de la Source de la Bièvre, Université de Versailles-Saint Quentin en Yvelines-Paris Saclay, UFR des Sciences de la Santé Simone Veil, F-78180 Montigny-le-Bretonneux, France

2: Service de Biologie Médicale, CHI de Poissy-St-Germain, F-78300, Poissy, France

3: Laboratoire de Biologie de la Reproduction. CHU de Rennes, F-35000, Rennes, France

\* to whom correspondence should be addressed

Université de Versailles-St-Quentin, Service de Biochimie et Biologie Moléculaire, UPRES-EA7404, UFR Paris-Ile de France Ouest, PRES Universud Paris, Centre Hospitalier de Poissy-Saint Germain, F-78303 Poissy cedex, France.

Email : esther.dos-santos@uvsq.fr

### Summary

**Introduction:** To investigate whether recurrent pregnancy loss (RPL) is associated with adipokine gene polymorphisms (namely the leptin -2548 (G/A), adiponectin 45 (T/G), and adiponectin 276 (G/T)) and/or adipokine serum levels.

**Material and Methods:** A total of 145 women participated in the study. For the analysis of serum adipokine levels, 14 healthy fertile women (control group) and 53 women suffering from RPL were included. Serum adipokine levels were determined using a commercial radioimmunoassay kit. For the polymorphism analysis, 126 women suffering from RPL were included. Leptin and adiponectin gene polymorphisms were analysed using an allele-specific PCR.

**Results:** The mean serum leptin and adiponectin levels were significantly higher in women with RPL than in controls (17.6 ng/ml *vs* 12.1 ng/ml and 10.24  $\mu$ g/ml *vs* 7.15  $\mu$ g/ml, for leptin and adiponectin, respectively; p<0.05). In contrast, the allele-specific study did not reveal any significant differences in allele frequency between the two groups.

**Conclusions:** A significant difference in leptinemia and adiponectinemia between women with RPL and controls suggests that these two adipokines may be involved in the pathophysiology of RPL.

### Introduction

Although between 10 and 15% of clinical pregnancies spontaneously abort, it is estimated that 0.5 to 1% of couples suffer from recurrent pregnancy loss (RPL) which is conventionally defined as at least three consecutive pregnancy losses before the 22<sup>nd</sup> week of gestation for the same couple. In most cases, pregnancy loss is associated with abnormal development of the foetal-placental unit (1). The prevalence of chromosome abnormalities in RPL is close to 50%, and up to 8 in 10 of these abnormalities correspond to aneuploidy - primarily due to premature separation of sister chromatids or to chromosome nondisjunction. Even though an aetiology cannot be identified for nearly half of the patients with RPL, a number of different factors have been implicated. These include advanced maternal age, reproductive tract malformations, hormonal problems, infections, immune disorders, thrombophilia, chromosome abnormalities, smoking, alcohol consumption, and obesity (2).

Leptin (encoded by the OB gene, located on chromosome 7q31.3) is an adipokine mainly produced by adipose tissue. Circulating leptin levels (normal range: 1-15 ng/ml) are directly proportional to the BMI. This cytokine-like hormone was originally described as a regulator of food intake and energy balance but always has a critical role in reproduction. Indeed, a variety of studies in rodents and humans suggest that leptin is involved in embryo-maternal cross-talk. Firstly, the normally infertile leptin knock-out (KO) mouse can reproduce after the injection of recombinant leptin (3-4). Leptin also promotes the development of the mouse embryo prior to implantation (5). In humans, serum leptin concentrations rise until 28 weeks of gestation, remain relatively constant thereafter, and fall soon after parturition - demonstrating that leptin is a placental hormone (6). Moreover, leptin is also produced by endometrial cells (7). The results of various *in vitro* studies have revealed that leptin acts as a critical hormone in human embryo implantation by controlling both placental development and endometrial receptivity (8).

Adiponectin (encoded by a gene located on chromosome 3q27) is another adipokine present at relatively high concentrations in blood plasma (5-15 µg/ml in humans, accounting for 0.01% of total plasma proteins). In contrast to leptin, adiponectin levels are inversely correlated with fat accumulation. Adiponectin has an important role in regulating energy homeostasis in general and lipid and glucose metabolism in particular (9). Furthermore, adiponectin exerts anti-inflammatory, anti-angiogenic, and anti-atherosclerotic effects in various tissues and cell types (10). Several data suggest that adiponectin can also directly regulate reproductive and placental processes (11). Adiponectin KO mice are subfertile (12) and transgenic mice displaying elevated circulating adiponectin levels are sterile (13). Furthermore, we have recently shown that adiponectin promotes syncytialization and the invasive capacities of human first-trimester cytotrophoblasts (14-16). In contrast to trophoblastic cells, endometrial cells produce and secrete adiponectin - suggesting that the latter has auto/paracrine actions. However, direct effects of adiponectin on human endometrial cells have not yet been unambiguously described. Lastly, we recently demonstrate that the adiponectin and leptin systems are altered in the endometrium of women with repeated, unexplained implantation failure. To be more precise, we found that (i) endometrial leptin expression was abrogated in infertile women and (ii) endometrial adiponectin receptor expression was reduced in infertile women compared to fertile women (17).

The literature data on the relationship between abnormal maternal adipokine levels and successful pregnancy are inconclusive. Hyperleptinaemia and hypo-adiponectinaemia have been observed in some pregnancy-associated pathologies, such as polycystic ovarian syndrome, endometriosis, and gestational diabetes (18-20). Elevated leptin concentrations are also observed in pre-eclampsia, and this increase is correlated with the severity of the pathology (21). Another study found that high circulating adiponectin levels were associated with *in vitro* fertilization success - suggesting that the maternal adiponectin levels could serve

as a marker for fertility (22). Lastly, there are only few, inconclusive data on circulating concentrations of leptin and adiponectin in the setting of first-trimester RPL (23-25).

It has been suggested that poor pregnancy outcomes are linked to genetic polymorphisms (26-27). For example, several polymorphisms of the TNF $\alpha$  gene might have a role in the pathogenesis of RPL. However, recent findings on the association between TNF $\alpha$  gene polymorphisms and RPL are contradictory (28). With regard to gene polymorphisms, various studies have found that the well-known leptin -2548 (G/A), adiponectin 276 (G/T), and adiponectin 45 (T/G) polymorphisms (all significantly involved in obesity and insulin resistance) are associated with the pathogenesis of pregnancy-associated diseases (especially pre-eclampsia and gestational diabetes mellitus) (29-33).

In view of this inconclusive findings, we set out to establish whether idiopathic RPL is associated with (i) adipokine gene polymorphisms (namely the leptin -2548 (G/A), adiponectin 45 (T/G), and adiponectin 276 (G/T)) and/or (ii) abnormal serum adiponectin and leptin levels.

### Materials and methods

### Patients

Fourteen healthy, fertile women were recruited as controls for the serum adipokine study. All had given birth to apparently healthy infants and had not displayed any pregnancy-related pathologies. The controls were recruited from our department of obstetrics prior to oocyte donation. None had a history of miscarriage, pre-eclampsia, ectopic pregnancy or preterm delivery. These women had at least one normal live birth. The mean  $\pm$  SEM (range) age of the control group was  $31.7 \pm 1.1$  and the mean BMI was  $24.25 \pm 1.23$  kg/m<sup>2</sup>. One hundred and twenty-six subjects with RPL were recruited from our active case file. Fifty-three of these patients participated in serum adipokine study. All of these women has experienced at least three first-trimester spontaneous abortions (at between 8 and 14 weeks of gestational age) with the same father. None had completed a term pregnancy. The women patients were screened for known miscarriage-associated factors, including anatomic malformations, parental chromosome abnormalities, hormone status (thyroid hormones and progesterone), ovarian reserve (anti-Müllerian hormone), antiphospholipid antibodies (such as lupus anticoagulant and anti-cardiolipin antibodies), prothrombotic risk factors, coagulation factor mutations, and infections (cytomegalovirus, rubella, HIV, chlamydia trachomatis, hepatitis, bacterial vaginosis, and group B streptococci). Serum samples were collected fasting from both the control and RPL groups during the implantation window (on day 22 of the menstrual cycle). Also, we excluded patients with history of smoking, drinking, drug use, and family disease; patients with reproductive tract abnormality, or endocrine disorder; patients with severe cardio-cerebrovascular disease, liver and kidney dysfunction; patients with comorbidity of depression and other mental disorders.

### Study design

This prospective study was performed at Poissy Saint-Germain General Hospital (Poissy, France). All patients provided their prior, written, informed consent to participation before sampling. The study was approved by the local independent ethics committee. After blood sampling, 2 ml of whole blood was collected into EDTA containing tubes, for genomic DNA extraction and was stored at -20°C and 2 ml of serum was stored immediately at -80°C until analysis.

### **Serological evaluations**

Serum leptin and adiponectin levels were evaluated using ELISA kits (Mediagnost, Reutlingen, Germany), according to the manufacturer's instructions. The limits of detection for leptin and adiponectin were respectively  $0.2 \mu g/l$  and  $0.6 \mu g/l$ .

### **DNA** genotyping

Genomic DNA was extracted from whole blood drawn and isolated with a QIAmp DNA Blood kit (QIAGEN, Hilden, Germany). Samples were stored at -80°C until use. DNA concentrations were measured with the NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, USA). Polymorphisms in the leptin gene (- 2548 G/A, rs 7799039) and the adiponectin gene (45 T/G, rs2241766 and 276 G/T, rs 1501299) were screened for by using TaqMan® SNP Genotyping Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the CFX96 real-time polymerase chain reaction (PCR) system (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France). The final reaction volume for PCR was 10  $\mu$ L, which contained 4.5  $\mu$ L of genomic DNA (5 ng/ $\mu$ L), 5  $\mu$ L of 20X VIC/FAM-labelled probe. The probes were designed according to the Human Pre-Designed Assay Systems (Applied Biosystems). PCRs were carried out in 96-well plates, each of which contained wild-type samples, heterozygous

samples, and homozygous samples (for example, respectively -2548 G/A, -2548 A/A, and -2548 G/G for leptin) of unknown genotype as positive controls and no-template controls (in which DNA was replaced by water) as negative controls. The thermal cycling conditions were as follows: 95°C for 10 min, and 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. This run was followed by an additional post-PCR plate read run at 60°C for 30 s. The data were analysed using the Allelic Discrimination Sequence Detection routine in CFX Manager<sup>TM</sup> software (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France).

### Statistical analysis

For the serum study, values were expressed as the mean  $\pm$  SEM, and RPL and control values were compared in an unpaired t test with Welch corrections. Comparisons between means of serum leptin/adiponectin ratio were analysed by unpaired Student's t-test. For each genotype and allele frequencies, we performed a chi-squared test using Graphpad Prism (version 3.0, Graphpad Software, San Diego, CA, USA). We used the NCBI frequency for each polymorphism as reference data for the control group. Lastly, we used logistic regression to estimate the odds ratios (ORs). The threshold for statistical significance was set to p<0.05.

### Results

### **Study population**

The clinical characteristics of the 126 women in the RPL group are summarized in **Table 1**. These women had (i) normal metabolic parameters (e.g. glycaemia, creatinine and protein plasma levels), (ii) a normal thyroid status (thyroid hormones and antibodies), (iii) no pro-thrombotic risk factors (normal hematologic parameters and the absence of factor V Leiden mutations), (iv) a normal ovarian cycle (progesterone levels), and (v) an adequate ovarian reserve (anti-Müllerian hormone levels). None of the women suffered from other serious disorders. For this reason, these women were classified into an idiopathic RPL group. The mean age in the RPL group was  $34 \pm 0.5$  and the mean BMI was  $24.4 \pm 0.4$  kg/m<sup>2</sup>.

### Serum adipokine levels

In the RPL group, the adiponectin concentrations in serum samples collected during the implantation window ranged from 2.2 to 19  $\mu$ g/ml. Despite this wide range throughout the whole group, the mean serum adiponectin concentration was significantly higher (p < 0.001) in the RPL group than in the control group (10.24  $\mu$ g/ml *versus* 7.15  $\mu$ g/ml, respectively; a 1.43-fold increase) (**Figure 1B**). In parallel, the mean serum leptin levels was also significantly higher (p < 0.03) in the RPL group than in the control group (17.6 ng/ml *versus* 12.11 ng/ml, respectively; a 1.45-fold increase) (**Figure 1A**). Lastly, the comparison of serum leptin/adiponectin ratio tend to an increase in the RPL group but our statistical analysis unfortunately did not reveal any significant difference between the two groups.

### **Allele frequencies**

The allele frequencies of leptin -2548 (G/A), adiponectin 276 (G/T), and adiponectin 45 (T/G) gene polymorphism are given in **Table 2**. We did not find statistically significant differences

(relative to NCBI frequencies) for any of the three polymorphisms studied (p=0.15, 0.87, and 0.67 for leptin -2548 (G/A), adiponectin 276 (G/T), and adiponectin 45 (T/G), respectively).

### Discussion

RPL is a complex, heterogeneous pathology. Several factors that influence miscarriage have now been identified. However, the exact aetiology of RPL is indeterminate in up to 50% of patients (34). The pleiotropic cytokines leptin and adiponectin attracted our attention because they are involved in the regulation of the inflammatory response, immunity, and endocrine and neoplastic diseases. A growing body of evidence suggest that these two adipokines mediate a number of complications of pregnancy, including RPL. However, the published studies are inconclusive (35). For example, two studies found that serum leptin levels were lower in women with a history of recurrent miscarriage than in women with a normal first trimester pregnancy 24h after miscarriage and after 5 to 6 and 7 to 8 weeks of pregnancy (23, 36). Another study performed during the first-trimester did not find any difference in the maternal serum leptin level between women with RPL and fertile women (25). Lastly, other studies subsequently demonstrated that serum leptin concentrations were higher in women with unexplained infertility than in fertile subjects during (i) the early follicular phase (day 3) of the menstrual cycle and (ii) the first trimester of pregnancy (37-39). The present study extended these findings by measuring serum leptin levels during the implantation window (on day 22 of the menstrual cycle) in women suffering from idiopathic RPL and in healthy controls. Our results clearly argue for a role for leptin in the physiopathology of RPL since leptinemia is higher in women with RPL compared to controls. So, in order to explain such discrepancies, different hypothesis could be proposed: (i) the inclusion criteria for patients with RPL differed somewhat from one study to another, (ii) a broad range of leptin concentrations has been observed in various populations (40), and (iii) the concentration may depend on the time at which the blood sample is collected (before or during the first trimester of pregnancy).

In contrast, relatively little is known about adiponectin's possible involvement in RPL. This is why we decided to also measure serum adiponectin levels. The present study is the first to have described significantly elevated adiponectin concentrations in women suffering from RPL (relative to fertile controls). Given the absence of an intergroup difference in the BMI values, our results suggest that the adiponectin concentration is also involved in RPL.

A growing body of evidence indicates that the leptin/adiponectin ratio (rather than the adiponectin level or the leptin level) may be a clinically useful marker for detecting certain pathologies. For example, the leptin/adiponectin ratio seems to be a good candidate for predicting future insulin resistance, atherosclerosis, metabolic syndrome, and (perhaps) cardiovascular disease in high-risk subjects (36, 41). Other studies have clearly demonstrated that the leptin/adiponectin ratio is significantly elevated in women with polycystic ovary syndrome (42-43). Our present data represent a novel example illustrating that an elevated leptin/adiponectin ratio seems to be associated to another reproductive pathology such as RPL. So, we can hypothesize that elevated serum leptin/adiponectin ratio in women during the implantation window may predict the risk of RPL (this data has not been demonstrated in this paper). Nevertheless, such results are not surprising since both adipokines play a critical role in the first steps of placental development and in the maintenance of pregnancy.

In parallel, we performed a genetic study intended to determine whether or not leptin -2548 (G/A), adiponectin 276 (G/T), and adiponectin 45 (T/G) gene polymorphisms were associated with the risk of RPL. In fact, we did not detect any significant associations. These findings are in line with a previous demonstration of the absence of a clinically meaningful correlation between leptin -2548 (G/A) and RPL (44). In contrast, our findings contrast with those of three other studies in which (i) the variant G allele of the adiponectin 276 polymorphism was associated with a 1.36-fold greater risk in Indian women with RPL (45), and (ii) the frequency of A allele gene of leptin -2548 polymorphism in Egyptian and Chinese women with RPL was

significantly higher than in control groups (46-47). There are several possible explanations for these discrepancies. Firstly, the number of cases of RPL (selected with stringent criteria) might have limited the power of our study; a post hoc sample size calculation indicates that over 1000 cases would be needed to detect a significant difference in allele frequency with a power of 80%. Secondly, it has been demonstrated that polymorphisms might vary from one ethnic group to another. More precisely, it has been reported that the adiponectin 45 polymorphism is significantly associated with the risk of type 2 diabetes mellitus in Japanese women (48) but not in French women (49). Hence, one cannot rule out similar genetic variability for the three polymorphisms studied here, with regard to RPL. Thirdly, other human adiponectin gene polymorphisms have been described; for example, the role of the 94 (T/G) polymorphism has not been clearly defined but, subject to further investigation, could potentially have a role in RPL (50). Lastly, one can hypothesize that adipokine signalling (more precisely, the AdipoR and ObR adipokine receptors for adiponectin and leptin, respectively) is altered in women with RPL. Indeed, it has already been reported that certain AdipoR and ObR polymorphisms are associated with reproductive traits or certain reproductive pathologies (such as preeclampsia, and haemolysis, elevated liver enzyme levels, and low platelet levels syndrome) (51-53). In conclusion, the present study is the first to show that leptin and adiponectin levels are significantly higher in RPL patients than in fertile controls. Consequently, the leptin/adiponectin ratio is abnormally elevated in women with RPL. In addition, our genetic study did not reveal any intergroup differences in adiponectin 276 (G/T), adiponectin 45 (T/G), and leptin -2548 (A/G) allele frequencies. Taken as a whole, our results nevertheless provide useful information on the pathophysiology of RPL. More research is needed to identify the basic physiological processes underlying the present findings and to determine the processes' potential clinical value.

### Acknowledgements

We thank the gynaecologists at Poissy Saint Germain General Hospital (Poissy, France) for recruiting the participants. This work was funded by the French Biomedicine Agency.

### Legend

Figure 1: (A) Serum leptin levels and (B) serum adiponectin levels in a control group of women (CONT) (n=14) and a group of women with RPL (n=53). The data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. \* p<0.03; \*\* p<0.001; unpaired t test with Welch corrections.
#### Bibliography

- 1. Hardy K, Hardy PJ: 1(st) trimester miscarriage: four decades of study. Transl Pediatr, 2015; (4): 189–200.
- 2. Lashen H, Fear K, Sturdee DW: Obesity is associated with increased risk of first trimester and recurrent miscarriage: matched case-control study. Hum Reprod Oxf Engl, 2004; (19): 1644–6.
- 3. Chehab FF, Lim ME, Lu R: Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. Nat Genet, 1996; (12):318–20.
- 4. Cunningham MJ, Clifton DK, Steiner RA: Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. Biol Reprod, 1999; (60): 216–22.
- 5. Kawamura K, Sato N, Fukuda J, Kodama H, Kumagai J, Tanikawa H, et al: Leptin promotes the development of mouse preimplantation embryos in vitro. Endocrinology, 2002; (143): 1922–31.
- 6. González RR, Simón C, Caballero-Campo P, Norman R, Chardonnens D, Devoto L, et al: Leptin and reproduction. Hum Reprod Update, 2000; (6): 290–300.
- González RR, Caballero-Campo P, Jasper M, Mercader A, Devoto L, Pellicer A, et al: Leptin and leptin receptor are expressed in the human endometrium and endometrial leptin secretion is regulated by the human blastocyst. J Clin Endocrinol Metab, 2000; (85): 4883–8.
- 8. Dos Santos E, Duval F, Vialard F, Dieudonné M-N: The roles of leptin and adiponectin at the fetal-maternal interface in humans. Horm Mol Biol Clin Investig, 2015; (24): 47–63.
- 9. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, et al: The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. Nat Med, 2001; (7): 941–6.
- 10. Tilg H, Moschen AR: Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. Nat Rev Immunol, 2006; (6): 772–83.
- 11. Schmidt T, Fischer S, Tsikolia N, Navarrete Santos A, Rohrbach S, Ramin N, et al: Expression of adipokines in preimplantation rabbit and mice embryos. Histochem Cell Biol, 2008; (129): 817–25.
- 12. Cheng L, Shi H, Jin Y, Li X, Pan J, Lai Y, et al: Adiponectin Deficiency Leads to Female Subfertility and Ovarian Dysfunctions in Mice. Endocrinology, 2016; (157): 4875–87.
- Combs TP, Pajvani UB, Berg AH, Lin Y, Jelicks LA, Laplante M, et al: A transgenic mouse with a deletion in the collagenous domain of adiponectin displays elevated circulating adiponectin and improved insulin sensitivity. Endocrinology, 2004; (145): 367–83.
- Benaitreau D, Dieudonné M-N, Dos Santos E, Leneveu M-C, Mazancourt P de, Pecquery R: Antiproliferative effects of adiponectin on human trophoblastic cell lines JEG-3 and BeWo. Biol Reprod, 2009; (80): 1107–14.

- 15. Benaitreau D, Dos Santos E, Leneveu M-C, Alfaidy N, Feige J-J, de Mazancourt P, et al: Effects of adiponectin on human trophoblast invasion. J Endocrinol, 2010; (207): 45–53.
- Benaitreau D, Dos Santos E, Leneveu M-C, De Mazancourt P, Pecquery R, Dieudonné M-N: Adiponectin promotes syncytialisation of BeWo cell line and primary trophoblast cells. Reprod Biol Endocrinol RBE, 2010; (8): 128.
- 17. Dos Santos E, Serazin V, Morvan C, Torre A, Wainer R, de Mazancourt P, et al: Adiponectin and leptin systems in human endometrium during window of implantation. Fertil Steril, 2012; (97): 771–8.
- 18. Toulis KA, Goulis DG, Farmakiotis D, Georgopoulos NA, Katsikis I, Tarlatzis BC, et al: Adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and a meta-analysis. Hum Reprod Update, 2009; (15): 297–307.
- 19. Takemura Y, Osuga Y, Harada M, Hirata T, Koga K, Morimoto C, et al: Serum adiponectin concentrations are decreased in women with endometriosis. Hum Reprod Oxf Engl, 2005; (20): 3510–3.
- 20. Lain KY, Daftary AR, Ness RB, Roberts JM: First trimester adipocytokine concentrations and risk of developing gestational diabetes later in pregnancy. Clin Endocrinol (Oxf), 2008; (69): 407–11.
- 21. Hogg K, Blair JD, von Dadelszen P, Robinson WP. Hypomethylation of the LEP gene in placenta and elevated maternal leptin concentration in early onset pre-eclampsia. Mol Cell Endocrinol, 2013; (367): 64–73.
- 22. Bersinger NA, Birkhäuser MH, Wunder DM: Adiponectin as a marker of success in intracytoplasmic sperm injection/embryo transfer cycles. Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol, 2006; (22): 479–83.
- 23. Lage M, Garcia-Mayor RV, Tomé MA, Cordido F, Valle-Inclan F, Considine RV, et al: Serum leptin levels in women throughout pregnancy and the postpartum period and in women suffering spontaneous abortion. Clin Endocrinol (Oxf), 1999; (50): 211–6.
- 24. Laird SM, Quinton ND, Anstie B, Li TC, Blakemore AI: Leptin and leptin-binding activity in women with recurrent miscarriage: correlation with pregnancy outcome. Hum Reprod Oxf Engl, 2001; (16): 2008–13.
- 25. Tommaselli GA, Di Spiezio Sardo A, Di Carlo C, Bifulco G, Cerrota G, Cirillo D, et al: Do serum leptin levels have a role in the prediction of pregnancy outcome in case of threatened miscarriage? Clin Endocrinol (Oxf), 2006; (65): 772–5.
- 26. Kacprzak M, Chrzanowska M, Skoczylas B, Moczulska H, Borowiec M, Sieroszewski P: Genetic causes of recurrent miscarriages. Ginekol Pol, 2016; (87): 722–6.
- 27. Shi X, Xie X, Jia Y, Li S: Maternal genetic polymorphisms and unexplained recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis. Clin Genet, 2016; (5): 2034.
- 28. Li H-H, Xu X-H, Tong J, Zhang K-Y, Zhang C, Chen Z-J: Association of TNF-α genetic polymorphisms with recurrent pregnancy loss risk: a systematic review and meta-analysis. Reprod Biol Endocrinol RBE, 2016; (14):6.

- 29. Saarela T, Hiltunen M, Helisalmi S, Heinonen S, Laakso M: Adiponectin gene haplotype is associated with preeclampsia. Genet Test, 2006; (10): 35–9.
- 30. Bienertová-Vasků J, Dostálová Z, Kanková K, Bienert P, Vasků A, Unzeitig V: Is there any link between severe pre-eclampsia and defined polymorphisms in leptin and adiponectin genes? J Obstet Gynaecol Res, 2008; (34): 858–64.
- 31. Drews K, Seremak-Mrozikiewicz A, Barlik M, Kurzawińska G, Wender-Ozegowska E, Iciek R, et al: (The (-2548G/A) polymorphism of leptin gene in women with gestational hypertension and preeclampsia). Ginekol Pol, 2008; (79): 358–63.
- 32. Sugathadasa BHKR, Tennekoon KH, Karunanayake EH, Kumarasiri JM, Wijesundere APDS: Association of -2548 G/A polymorphism in the leptin gene with preeclampsia/pregnancy-induced hypertension. Hypertens Pregnancy, 2010; (29): 366–74.
- 33. Low CF, Mohd Tohit ER, Chong PP, Idris F: Adiponectin SNP45TG is associated with gestational diabetes mellitus. Arch Gynecol Obstet, 2011; (283): 1255–60.
- 34. Rai R, Regan L: Recurrent miscarriage. Lancet Lond Engl, 2006; (368): 601–11.
- 35. Li TC, Makris M, Tomsu M, Tuckerman E, Laird S: Recurrent miscarriage: aetiology, management and prognosis. Hum Reprod Update, 2002; (8): 463–81.
- 36. Zaletel J, Barlovic DP, Prezelj J: Adiponectin-leptin ratio: a useful estimate of insulin resistance in patients with Type 2 diabetes. J Endocrinol Invest, 2010; (33): 514–8.
- 37. Demir B, Guven S, Guven ESG, Atamer Y, Gunalp GS, Gul T: Serum leptin level in women with unexplained infertility. J Reprod Immunol, 2007; (75): 145–9.
- Saeed Z, Haleh S, Afsaneh M, Soheila A, Amir Hassan Z, Farah I, et al: Serum leptin levels in women with immunological recurrent abortion. J Reprod Infertil, 2010; (11): 47– 52.
- 39. Baban RS, Ali NM, Al-Moayed HA: Serum leptin and insulin hormone level in recurrent pregnancy loss. Oman Med J, 2010; (25): 203–7.
- 40. Nicklas BJ, Toth MJ, Goldberg AP, Poehlman ET: Racial differences in plasma leptin concentrations in obese postmenopausal women. J Clin Endocrinol Metab, 1997; (82): 315–7.
- 41. Cho S-A, Joo HJ, Cho J-Y, Lee SH, Park JH, Hong SJ, et al: Visceral Fat Area and Serum Adiponectin Level Predict the Development of Metabolic Syndrome in a Community-Based Asymptomatic Population. PloS One, 2017; (12): e0169289.
- 42. Xita N, Papassotiriou I, Georgiou I, Vounatsou M, Margeli A, Tsatsoulis A: The adiponectin-to-leptin ratio in women with polycystic ovary syndrome: relation to insulin resistance and proinflammatory markers. Metabolism, 2007; (56): 766–71.
- 43. Lecke SB, Mattei F, Morsch DM, Spritzer PM: Abdominal subcutaneous fat gene expression and circulating levels of leptin and adiponectin in polycystic ovary syndrome. Fertil Steril, 2011; 95: 2044–9.

- 44. Chin JR, Heuser CC, Eller AG, Branch DW, Nelson LT, Silver RM: Leptin and leptin receptor polymorphisms and recurrent pregnancy loss. J Perinatol Off J Calif Perinat Assoc, 2013; (33): 589–92.
- 45. Verma PK, Prakash S, Parveen F, Faridi RM, Agrawal S: Genetic association of adipokine and UCP2 polymorphism with recurrent miscarriage among non-obese women. Reprod Biomed Online, 2012; (25): 527–35.
- 46. Zidan HE, Rezk NA, Alnemr AAA, Moniem MIA: Interleukin-17 and leptin genes polymorphisms and their levels in relation to recurrent pregnancy loss in Egyptian females. Immunogenetics, 2015; (67): 665–73.
- 47. Wang C-Y, Wang S-G, Wang J-L, Zhou L-Y, Liu H-J, Wang Y-F: Effect of miRNA-27a and Leptin Polymorphisms on Risk of Recurrent Spontaneous Abortion. Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res, 2016; (22): 3514–22.
- 48. Hara K, Boutin P, Mori Y, Tobe K, Dina C, Yasuda K, et al: Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with an increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. Diabetes, 2002; (51): 536–40.
- 49. Vasseur F, Helbecque N, Dina C, Lobbens S, Delannoy V, Gaget S, et al: Singlenucleotide polymorphism haplotypes in the both proximal promoter and exon 3 of the APM1 gene modulate adipocyte-secreted adiponectin hormone levels and contribute to the genetic risk for type 2 diabetes in French Caucasians. Hum Mol Genet, 2002; (11): 2607–14.
- 50. Rudofsky G, Schlimme M, Schlotterer A, von Eynatten M, Reismann P, Tafel J, et al: No association of the 94T/G polymorphism in the adiponectin gene with diabetic complications. Diabetes Obes Metab, 2005; (7): 455–9.
- 51. Jafarikia M, Méthot S, Maignel L, Fortin F, Wyss S, Sullivan B, et al: Association of adiponectin and adiponectin receptor genes with sow productivity estimated breeding values. Mol Biol Rep, 2015; (42): 1391–401.
- 52. Tennekoon KH, Indika WL, Sugathadasa R, Karunanayake EH, Kumarasiri J, Wijesundera A: LEPR c.668A>G polymorphism in a cohort of Sri Lankan women with pre-eclampsia / pregnancy induced hypertension: a case control study. BMC Res Notes, 2012; (19): 308.
- 53. Várkonyi T, Lázár L, Molvarec A, Than NG, Rigó J, Nagy B: Leptin receptor (LEPR) SNP polymorphisms in HELLP syndrome patients determined by quantitative real-time PCR and melting curve analysis. BMC Med Genet, 2010; (11): 11:25.





 $\checkmark$ 

(lm / gu) elsvel nitoenoqibA



**Table 1**: Summary of clinical characteristics of the women with RPL (n=126)

	Parameter	Patient value	Reference value
General informations	Age (years)	$34 \pm 0.5$	
	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	$24.42 \pm 0.49$	18 - 25
<b>Biochemical tests</b>	Glycemia (mmol/l)	$4.85 \pm 0.06$	3.6 - 6.1
	Plasma creatinine (µmol/l)	61.71 ± 1.07	44 - 84
	Total plasma proteins (g/l)	71.73 ± 0.48	66 - 81
Hormonal tests	Progesterone (ng/ml)	9.95 ± 0.73	> 5 when ovulation success
	T4 free (pmol/l)	14.07 ± 0.17	9 - 20
	Anti-mullerian hormone (ng/ml)	$4.65 \pm 0.68$	0.03-7.37
Hematological test	Prothrombin ratio (%)	103.87 ± 1.35	70 - 120
	Activated cephalin time (sec)	29.41 ± 0.33	25 - 35
	International normalized ratio	1.01 ± 0.01	0.8 - 1.15
	Blood platelets (g/l)	271.31 ± 7.46	150 - 400
Immunological tests	Anti- thyroglobulin antibody (U/ml)	3.010 ± 0.88	< 4.2
	Anti-thyroid peroxidase antibody (U/ml)	2.34 ± 1.13	< 6
Thrombotic tests	Fibrinogene (g/l)	2.82 ± 0.06	2 - 4
	Coagulation factor XII	104.64 ± 3.56	60 - 120
	Anti-thrombin antibody (%)	$106.02 \pm 1.01$	80 - 130
	Homocysteine (µmol/l)	9.41 ± 0.27	4.4 - 13.6
	Coagulation factor II mutation (R506Q)	4 patients	Absence or presence of only
	Coagulation factor V Leiden mutation (G20210A)	1 patient	1 mutation does not affect the thrombotic risk

## Table 2: Allele frequencies of leptin -2548 (G/A), adiponectin 276 (G/T), and adiponectin 45 (T/C) polymorphisms in women with RPL compared to NCBI frequencies

	Allele frequency in women with RPL (n=126)	Allele frequency in European reference population (NCBI frequency)	Odds Ratio (OR)	Confidence interval (95% CI)	p-value	
Leptin -2548 (G/A)						
Allele G	62.3	56	1.30	0.91-1.85	0.15())	
Allele A	37.7	44	0.77	0.54-1.10	0.15 (ns)	
Adiponectin 276 (G/T)						
Allele G	71.43	72	0.97	0.66-1.43	0.07())	
Allele T	28.71	28	1.03	0.70-1.52	0.87 (ns)	
Adiponectin 45 (T/C)						
Allele T	85.71	87	0.90	0.54-1.49	0.67 (ma)	
Allele G	14.29	13	1.12	0.67-1.86	0.07 (ns)	

ns : not significant

## **R**ÔLES DE L'ADIPONECTINE DANS LA NUTRITION HISTIOTROPHE

## ETUDE DU MÉTABOLISME DU GLYCOGÈNE ENDOMÉTRIAL ET DE SON DEVENIR DANS LES CELLULES PLACENTAIRES

## ${\scriptstyle \text{ARTICLE}} \ 3$

# Regulation of glycogen metabolism and trafficking by adiponectine at the fetal-maternel interface

**Fabien Duval**, Esther Dos Santos, Benoît Maury, Valérie Sérazin, Khadidja Fatthalah, François Vialard, Marie-Noëlle Dieudonné

### HUMAN MOLECULAR REPRODUCTION (2017)

#### Introduction

Le placenta est un organe transitoire composé de cellules d'origine embryonnaires : les cellules trophoblastiques. Au cours de la phase d'invasion trophoblastique spécifique de la mise en place de la placentation hémochoriale, les cytotrophoblastes extravilleux (CTEV) acquièrent un phénotype invasif leur permettant d'assurer l'ancrage de l'embryon à l'endomètre maternel. Parallèlement, les CTEV colonisent également les artères spiralées utérines et forment des « bouchons trophoblastiques » empêchant le sang maternel de remplir la chambre intervilleuse. Ceux-ci perdurent dans les artères utérines jusqu'à la 8ème semaine de grossesse. Ils se désagrègent ensuite progressivement, et disparaissent complètement à la 12ème semaine de grossesse.

Ainsi, lors des stades précoces de son développement, l'embryon est nourri par la voie histiotrophe. Cette voie correspond à l'absorption par le syncytiotrophoblaste (ST) des sécrétions glandulaires endométriales, présentes dans la chambre intervilleuse.

L'accumulation de molécules nutritives au sein des cellules stromales endométriales (CSE) a lieu au cours de la décidualisation, sous l'influence des hormones ovariennes (17 $\beta$ -estradiol et progestérone). Les CSE sont ainsi capables de synthétiser des acides aminés, des lipides et de grandes quantités de glycogène. Le glycogène endométrial semble jouer un rôle majeur au cours de la grossesse. En effet, une étude a mis en évidence une diminution des taux de glycogène dans l'endomètre de femmes infertiles par comparaison avec des femmes fertiles. De plus, la production de glycogène augmente tout au long de la décidualisation et est maximale au milieu de la phase sécrétoire, correspondant à la période de réceptivité utérine à l'embryon. Cette synthèse s'accompagne d'une modification du profil d'expression et d'activation des enzymes impliquées dans la glycogénogénèse telles que la phosphoinositide-3-kinase (PI3K), la glycogène synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), la glycogène synthase (GS) et la glycogène phosphorylase (GP).

A ce jour, peu de données décrivent les mécanismes de transport du glycogène endométrial vers le placenta. Certaines études suggèrent fortement la mise en place d'un mécanisme d'exocytose endométriale suivi d'une endocytose placentaire.

De plus, plusieurs données de la littérature suggèrent que les protéines endométriales absorbées par le placenta sont dirigées vers les lysosomes pour y être dégradées en acides aminés. Ceux-ci peuvent être réutilisés par les cellules trophoblastiques ou transmis au fœtus. De la même manière, l'étude des glycogénoses (pathologies liées à une accumulation anormale de glycogène dans les cellules) a permis de mettre en évidence l'existence d'un transport du glycogène des endosomes vers les lysosomes. Le glycogène y est alors hydrolysé par l' $\alpha$ -glucosidase acide. Les molécules de glucoses formées sont ensuite réexportées vers le cytoplasme pour participer à la glycolyse. Ce processus appelé glycophagie est observé dans les cellules musculaires notamment et pourrait participer à la nutrition fœtale au cours du premier trimestre de grossesse.

L'adiponectine est une adipokine largement décrite pour son action insulino-sensibilisatrice dans le foie et le muscle. Plus précisément, elle favorise la consommation et le catabolisme des glucides et des lipides dans le but de produire de l'énergie. Ces effets sont observés suite à l'activation de la kinase dépendante de l'AMP (AMPK). Le rôle de l'adiponectine dans l'endomètre humain est peu décrit. Cependant, les données de la littérature suggèrent un rôle important de l'adiponectine dans ce tissu au cours de l'implantation embryonnaire. En effet, l'expression de ces deux récepteurs spécifiques (ADIPOR1 et ADIPOR2) est maximale dans l'endomètre en période de réceptivité utérine. De plus, l'expression des ADIPOR est diminuée dans les endomètres de femmes infertiles. Enfin, notre étude réalisée *in vitro* démontre que l'adiponectine limite la décidualisation et l'invasion trophoblastique au sein des CSE (article 1).

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail a consisté à étudier le rôle de l'adiponectine sur le métabolisme et le trafic du glycogène à l'interface fœto-maternelle. Pour cela, nous avons tout d'abord étudié l'absorption et le métabolisme du glucose conduisant à l'accumulation et à la sécrétion de glycogène dans les CSE. Dans une deuxième partie, nous avons étudié l'absorption du glycogène et son utilisation par les CTV issus de placenta de premier trimestre.

#### Matériels et Méthodes

**Population d'étude.** Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux deux acteurs de l'interface fœtomaternelle. Nous avons donc inclus 26 femmes âgées de 25 à 41 ans (âge moyen  $34,5 \pm 1,0$  ans) qui ont subi une biopsie endométriale au CHIPS. Ces biopsies sont réalisées durant la fenêtre implantatoire lors d'un diagnostic de fertilité. En parallèle, les placentas de 11 femmes subissant une interruption volontaire de grossesse réalisée entre 4 et 10 semaines de grossesse ont été collectés au CHIPS. Les patientes ont un âge compris entre 18 ans et 44 ans (âge moyen  $28,0 \pm 3,0$  ans).

**Culture des CSE humaines**. Les biopsies sont tout d'abord lavées abondamment dans du sérum physiologique froid en présence d'antibiotiques, afin d'éliminer les éventuelles traces de sang. Puis, le tissu endométrial est émincé en fragments de 1 mm<sup>3</sup> environ qui sont ensuite digérés en deux étapes.

<u>Digestion 1</u> : Les fragments sont incubés 1 heure à 37°C dans un milieu DMEM/F12 contenant de la collagénase A (0,1%), de la DNAse de type I (0,5 ‰) et des antibiotiques (pénicilline (10  $\mu$ g/ml) et streptomycine (100 U/ml)). A l'issue de cette première digestion, le surnageant contenant les CSE est filtré sur une membrane de nylon (100  $\mu$ m) et centrifugé 10 minutes à 200g. Le culot cellulaire issu de cette centrifugation est ensuite repris dans un milieu de lavage (DMEM/F12 et antibiotiques) et centrifugé à nouveau 10 minutes à 200g.

<u>Digestion 2</u> : En parallèle, le tissu endométrial non-digéré subit une seconde digestion de 10 minutes à 37°C dans un milieu DMEM/F12 contenant de la trypsine (0,25%), de la DNAse de type I (0,1%), de l'EDTA (0,03%) et des antibiotiques (pénicilline (10  $\mu$ g/ml) et streptomycine (100 U/ml)). L'action de la trypsine est ensuite inhibée par l'ajout (volume/volume) de milieu de culture composé de DMEM/F12 contenant du sérum de veau fœtal (10%) et des antibiotiques (pénicilline (10  $\mu$ g/ml) et streptomycine (100 U/ml)). Le produit de cette digestion est filtré sur une membrane de nylon (40  $\mu$ m) et centrifugé 10 minutes à 200g.

Les culots cellulaires issus de ces deux digestions sont alors réunis. Les CSE sont ensemencées dans un milieu de culture composé de DMEM/F12 contenant du sérum de veau fœtal (10%) et des antibiotiques (pénicilline (10  $\mu$ g/ml) et streptomycine (100 U/ml)) et placées à 37°C sous 5% CO<sub>2</sub> en atmosphère humide. Le lendemain, les cellules sont lavées, afin d'éliminer les hématies et les débris cellulaires. Les

cellules sont maintenues en présence du milieu de culture décrit ci-dessus pendant 48 heures, temps nécessaire pour que les CSE atteignent un état de confluence proche de 100%. La décidualisation est alors induite. Les CSE sont mises en présence d'un milieu de différenciation constitué de DMEM/F12 contenant du sérum de veau fœtal traité au charbon (2%), de la progestérone ( $10^{-6}$  M), du 17 $\beta$ -estradiol ( $10^{-8}$  M) et des antibiotiques (pénicilline ( $10 \mu g/ml$ ) et streptomycine (100 U/ml)), supplémenté ou non en adiponectine (25 ng/ml ou 250 ng/ml). La décidualisation *in vitro* est réalisée durant 15 jours.

**Etude de la consommation de glucose par les CSE.** L'expression des transporteurs de glucose (GLUT1 et GLUT3) dans les CSE a été étudiée par RT-qPCR après 3 jours (D3), 8 jours (D8) et 15 jours (D15) de mise en différenciation, en présence ou non d'adiponectine. En parallèle, le dosage de glucose dans les surnageants de culture des CSE à D3, D8 et D15 de différenciation a été réalisé afin d'évaluer directement la consommation de glucose par les CSE.

**Etude du catabolisme du glucose dans les CSE**. Afin d'étudier l'utilisation du glucose par les CSE, la production de lactate dans les surnageants de culture a été mesurée. En parallèle, la production d'ATP total par les CSE a été réalisée par un dosage fluorométrique (kit Abcam ab83355).

**Etude de la glycogénogénèse dans les CSE**. L'accumulation et la sécrétion de glycogène par les CSE a été réalisée par dosage fluorométrique. En parallèle, l'expression de la GS et de la GP dans les CSE a été mesurée par RT-qPCR à D3, D8 et D15 de différenciation (kit Sigma MAK016).

Etude des voies de signalisation activées par l'adiponectine dans les CSE. Les CSE ont été cultivées pendant 15 jours en présence ou non d'adiponectine. A D15, deux voies de signalisation de l'adiponectine (AMPK et PI3K) impliquées dans le métabolisme du glucose et du glycogène ont été étudiées par immunoblot. L'activation de l'AMPK a été évaluée par la mesure du ratio phospho-AMPK $\alpha$ /total-AMPK $\alpha$ . L'activation de la PI3K a été évaluée par la mesure du ratio phospho-GSK3 $\beta$ /total-GSK3 $\beta$ . En parallèle, les CSE ont été cultivées en présence du composé C (inhibiteur de l'AMPK) ou du LY294002 (inhibiteur de la PI3K) avec ou sans adiponectine. A l'issu de cette incubation (D15), le dosage fluorométrique du glycogène intracellulaire a été réalisé dans les CSE.

Culture de CTV humains. Les placentas sont tout d'abord lavés abondamment dans du sérum physiologique froid pour éliminer les éventuelles traces de sang. Puis, le tissu placentaire est émincé en fragments de 1 mm<sup>3</sup> environ, afin d'isoler les villosités placentaires. Les villosités sont à nouveau rincées abondamment dans du sérum physiologique froid et centrifugées deux fois durant 5 minutes à 200g afin d'éliminer les hématies. Le tissu placentaire est ensuite incubé dans un milieu de digestion pendant 15 minutes à 37°C, composé d'HBSS 1X contenant de la trypsine (0,125%), de la DNAse de type IV (50 U/ml), de l'hepes (25 mM) et MgSO<sub>4</sub> (4,2 mM). Cinq à six digestions sont ainsi réalisées. Les surnageants de chaque digestion sont filtrés sur une membrane de nylon (100 µm), rassemblés et conservés à 37°C. Le reliquat de tissu digéré subit alors une dizaine de lavages avec le tampon HBSS 1X chaud. Les surnageants de chaque lavage sont filtrés sur une membrane de nylon (100  $\mu$ m), rassemblés et conservés à 37°C. Les filtrats issus des digestions et des lavages sont alors centrifugés 10 minutes à 200g. Les culots cellulaires sont réunis et repris dans un milieu de culture composé de DMEM/F12, de sérum de veau fœtal (10%) et d'antibiotiques (pénicilline (10 µg/ml) et streptomycine (100 U/ml)). Après filtration sur nylon (40 µm), les cellules sont déposées sur un gradient de Percoll (20-55%) et centrifugées 25 minutes à 1000g. Les trophoblastes sont prélevés aux interfaces 40-45% et 45-55% puis lavés abondamment dans le milieu de culture décrit précédemment avant d'être centrifugés 10 minutes à 200g. Les cytotrophoblastes villeux (CTV) sont ensemencés dans un milieu de culture composé de DMEM/F12 contenant du sérum de veau fœtal (10%) et des antibiotiques (pénicilline (10 µg/ml) et streptomycine (100 U/ml)) et placées à 37°C sous 5% CO<sub>2</sub> en atmosphère humide. Le lendemain, les CTV sont placées dans un milieu DMEM/F12 contenant du sérum de veau fœtal (1%) et des antibiotiques (pénicilline (10 µg/ml) et streptomycine (100 U/ml)), supplémenté ou non en adiponectine (25 ng/ml ou 250 ng/ml) pendant 48 heures, temps nécessaire pour que les CTV fusionnent spontanément en ST.

**Etude du transport du glycogène endométrial vers les CTV.** Pendant 24 h, les CTV ont été maintenus en présence de milieux conditionnés issus de CSE décidualisées et cultivées en présence ou non d'adiponectine. Des milieux de culture issus de CSE non-décidualisées ont été utilisés comme contrôles négatifs. L'accumulation de glycogène dans les CTV a ensuite été mesurée par dosage fluorométrique.

L'objectif est de démontrer que le glycogène sécrété par les CSE (et présents dans les milieux conditionnés) a été réabsorbé par les CTV.

Etude de l'absorption de FITC-Dextran par les CTV. Comme le glycogène, le dextran est un polymère de glucoses reliés entre eux par des liaisons osidiques  $\alpha(1\rightarrow 6)$  et  $\alpha(1\rightarrow 4)$ . Ainsi, lors d'études *in vitro*, le dextran peut constituer un analogue du glycogène. Ici, les CTV ont été cultivés pendant 48 h en présence d'adiponectine. Puis, les cellules sont incubées pendant 2 h, en présence de dextran couplé à un fluorochrome, l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC-Dextran), afin de quantifier l'entrée de ce polymère de glucoses dans les CTV. L'analyse d'absorption de ce dextran par les CTV a été réalisée par une approche de cytométrie en flux (cytomètre de flux LSR Fortessa, BD Biosciences).

**Devenir du FITC-Dextran absorbé par le CTV.** Un immunomarquage de la protéine EEA-1 (un marqueur spécifique des endosomes) et de la protéine LAMP-1 (un marqueur spécifique des lysosomes) a été réalisé dans les CTV maintenus en culture pendant une durée variable (30 min à 6 h) et fixés par du paraformaldéhyde 4%. L'objectif est d'observer une potentielle co-localisation entre le dextran et les compartiments subcellulaires afin de préciser le trafic du glycogène dans les CTV.

#### Résultats et Conclusions

L'expression de GLUT1 et de GLUT3 au cours de la différenciation cellulaire des CSE (D3, D8 et D15) a été étudiée par RT-qPCR. Concernant GLUT1, nous avons mesuré une augmentation de l'expression de cette isoforme au cours de la décidualisation (entre D3 et D15). Nous avons également observé que (i) l'adiponectine (25 ng/ml) augmente l'expression de GLUT1 (+54% et +49% à D8 et D15, respectivement) et (ii) l'adiponectine (250 ng/ml) augmente l'expression de GLUT1 (+94%, +170% et +129% à D3, D8 et D15, respectivement). De manière intéressante, le profil d'expression de GLUT3 au cours de la différenciation est totalement opposé à celui de GLUT1. En effet, une diminution de l'expression de ce transporteur est observée entre D3 et D15. En revanche, l'adiponectine ne semble pas à avoir d'effet sur l'expression de GLUT3, quel que soit la dose testée.

En parallèle, nous avons effectué un dosage de glucose restant dans les surnageants de culture cellulaire, à D3, D8 et D15 de différenciation des CSE. Nous avons observé que l'adiponectine (25 ng/ml) induit

• 194 •

une réduction des taux de glucose dans les surnageants à D15 exclusivement (-19%). En revanche, l'adiponectine (250 ng/ml) induit une diminution significative de la concentration en glucose dans les surnageants (-9%, -17%, -21% à D3, D8 et D15, respectivement). L'ensemble de ces résultats démontre que l'adiponectine augmente la consommation de glucose par les CSE probablement *via* l'augmentation de GLUT1.

Afin d'étudier le devenir du glucose dans les CSE, nous nous sommes intéressés à la production d'ATP et de lactate par ces cellules. Nous avons tout d'abord démontré que la production d'ATP ne varie pas au cours de la différenciation. En revanche, l'ajout d'adiponectine induit une réduction de la production d'ATP mesurée à D15 (-32% et -34% à 25 ng/ml et 250 ng/ml, respectivement). En parallèle, nous avons également observé que l'adiponectine inhibe la production de lactate par les CSE à D15 (-46% pour les deux doses testées). Ainsi, l'adiponectine semble limiter le catabolisme du glucose dans les CSE.

Nous nous sommes donc intéressés au rôle de l'adiponectine sur le contrôle de la glycogénogénèse. Tout d'abord, nous avons étudié par RT-qPCR l'expression de deux enzymes, la glycogène synthase (GS) et la glycogène phosphorylase (GP) tout au long de la décidualisation. Dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas observé de modification d'expression de ces deux enzymes au cours du processus de différenciation cellulaire. De la même manière l'adiponectine (25 ng/ml et 250 ng/ml) n'influence pas l'expression de la GP, quel que soit le temps d'exposition. En revanche, après 15 jours de culture, nous avons observé que l'adiponectine augmente significativement l'expression de la GS (+71% et +56% à 25 ng/ml et 250 ng/ml, respectivement). Parallèlement, nous avons réalisé un dosage intracellulaire du glycogène accumulé par les CSE à D15, en présence ou non d'adiponectine. Nos résultats montrent que **l'adiponectine favorise la production de glycogène dans les CSE** (+34% à 250 ng/ml) et que cet effet est associé à une augmentation de l'expression de la GS, l'enzyme clé de la glycogénogenèse.

Afin d'identifier la voie de signalisation de l'adiponectine impliquées dans l'accumulation de glycogène dans les CSE, nous nous sommes intéressés aux voies de l'AMPK et de la PI3K. L'AMPK est impliquée dans l'inhibition de la synthèse de glycogène afin de diriger le glucose vers la glycolyse aérobie et la production d'ATP. A l'inverse la PI3K favorise la production de glycogène en inhibant par phosphorylation la GSK3β (elle-même inhibitrice de la GS). Ainsi, nous avons mesuré les effets d'un

traitement des CSE pendant 15 jours avec l'adiponectine (25 ng/ml et 250 ng/ml) sur la phosphorylation de l'AMPK $\alpha$  (Thr-172) et de la GSK3 $\beta$  (Ser-9). Nos résultats d'immunoblot révèlent que l'adiponectine induit une réduction de la phosphorylation de l'AMPK $\alpha$  (-19% et -25% à 25 ng/ml et 250 ng/ml, respectivement). A l'inverse, elle favorise la phosphorylation de la GSK3 $\beta$ , à la dose de 250 ng/ml uniquement (+69%). Ces résultats montrent que l'adiponectine active la voie de la PI3K dans les CSE, au détriment de la voie de l'AMPK.

Nous avons souhaité confirmer cette hypothèse en mesurant l'accumulation de glycogène dans les CSE cultivées pendant 15 jours en présence d'adiponectine et/ou d'un inhibiteur de l'AMPK (composé C) et d'un inhibiteur de la PI3K (LY294002). Nous avons observé qu'en présence de composé C, l'adiponectine (250 ng/ml) augmente l'accumulation de glycogène dans les CSE (+45%). En revanche, en présence de LY294002, l'effet positif de l'adiponectine sur la synthèse de glycogène n'est plus observé (-19%). **Il semblerait donc que l'effet positif de l'adiponectine sur la glycogénogenèse dans les CSE soit réalisé par l'activation de la voie PI3K**.

Le dosage de glycogène dans les surnageants de culture de CSE soumises à l'action de l'adiponectine démontre que cette adipokine favorise également la sécrétion du glycogène endométrial (+92% et +167% à 25 ng/ml et 250 ng/ml, respectivement). De plus, les CSE non-décidualisées produisent de faibles taux de glycogène (-61%) par comparaison avec les CSE décidualisées. L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'accumulation et la sécrétion de glycogène sont dépendantes de l'état de différenciation des CSE. De plus, **l'adiponectine augmente la sécrétion de glycogène par les CSE**.

Par la même approche que précédemment, nous avons mesuré l'accumulation de glycogène dans les CTV soumis à des milieux conditionnés issus de culture de CSE placées en présence d'adiponectine pendant 15 jours. Nous avons observé une augmentation de l'accumulation de glycogène dans les CTV maintenus en présence de milieux conditionnés issus de CSE cultivées en présence d'adiponectine (+16% et +12% à 25 ng/ml et 250 ng/ml, respectivement). Cependant, lorsque les CTV sont maintenus en présence de milieux conditionnés issus de CSE non-décidualisées, nous avons observé une moindre accumulation de glycogène dans leur cytoplasme (-48%). Cela suggère donc que plus le milieu est riche en glycogène, plus les CTV absorbe cette molécule. Des mécanismes de contrôle de l'entrée du

glycogène pourraient donc se mettre en place, selon la concentration de glycogène disponible pour les CTV.

Nous avons confirmé par une approche de microscopie confocale que les CTV absorbent le glycogène en utilisant le FITC-Dextran, qui mime la molécule de glycogène. Nous avons observé que les CTV absorbent de moins grandes quantités de FITC-Dextran après 48 h de traitement en présence d'adiponectine (25 ng/ml et 250 ng/ml) comparativement à la situation contrôle (-18% pour les deux doses testées). L'adiponectine semble donc diminuer l'absorption du glycogène par les CTV.

Afin de démontrer que le FITC-Dextran est absorbé par endocytose par les CTV, nous avons réalisé des expériences de colocalisation entre cette molécule et la protéine EEA-1, spécifique des endosomes. Nous avons ainsi observé que lorsque les CTV sont mis en présence de FITC-Dextran pendant 30 minutes, ce polysaccharide et la protéine EEA-1 colocalisent de manière quasi-parfaite (coefficient de Pearson égal à 0,80). **Ce résultat suggère que le FITC-Dextran est absorbé par endocytose**. En revanche, plus la durée d'incubation est longue, moins ces deux molécules semblent être associées (coefficient de Pearson égal à 0,48 après 6h d'incubation). Ces résultats supposent que le dextran est déplacé des endosomes vers un autre organite intracellulaire dans les CTV.

Dans une dernière partie, nous avons suivi la localisation du dextran et de la protéine LAMP-1, un marqueur lysosomal. L'analyse en microscopie confocale révèle une co-localisation assez faible entre ces deux évènements après 30 min d'incubation (coefficient de Pearson égal à 0,59). En revanche, après 6 h en présence de FITC-Dextran, nous avons observé une forte association entre ce polysaccharide et les lysosomes (coefficient de Pearson de 0,76). Il semblerait donc qu'une fois endocyté, le dextran serait dirigé des endosomes vers les lysosomes. Nous pouvons donc supposer que le glycogène comme le dextran subit un processus de dégradation lysosomale dans le but de produire de nouvelles molécules de glucose utilisables par les cellules trophoblastiques ou le fœtus.

#### Discussion

Cette étude révèle que l'adiponectine favorise la synthèse et la sécrétion de glycogène par l'endomètre. Plus précisément, elle stimule la glycogénogenèse en (i) augmentant la consommation de glucose, (ii) inhibant le catabolisme glucidique et (iii) activant la voie de la PI3K dans les cellules endométriales humaines. Il semblerait donc que l'adiponectine induit la mise en place d'un environnement endométrial bénéfique à l'implantation et à la survie embryonnaires.

Nous avons également observé que les cellules trophoblastiques sont capables d'absorber ce glycogène endométrial. Il apparaît également que plus le milieu est riche en glycogène, plus les cellules absorbent de grandes quantités de glycogène. Cela suggère que des mécanismes de contrôle de l'entrée du glycogène se mettent en place dans le placenta, afin de limiter la consommation de glycogène endométrial. Nous avons ainsi observé que l'adiponectine joue ce rôle en contrôlant négativement l'endocytose des polysaccharides par les CTV.

En conclusion, l'adiponectine semble être un facteur favorable à l'implantation embryonnaire et au développement de l'embryon, en induisant la production de glycogène par l'endomètre. Parallèlement, elle joue un rôle de régulateur de la nutrition histiotrophe, en limitant l'entrée des sécrétions endométriales, et plus particulièrement du glycogène, dans les cellules placentaires. L'adiponectine serait donc, dès les premiers stades de la grossesse, une molécule clé de la régulation de l'apport nutritif à l'embryon.

1	Adiponectin regulates glycogen metabolism and trafficking at the human
2	fetal-maternal interface
3	
4	Fabien Duval <sup>1</sup> , Esther Dos Santos <sup>1,2</sup> , Benoît Maury <sup>1</sup> , Valérie Serazin <sup>1,2</sup> , Khadija Fathallah <sup>1,3</sup> , François
5	Vialard <sup>1,3</sup> and Marie-Noëlle Dieudonné <sup>1*</sup>
6	
7	1. GIG - EA 7404, Université de Versailles-Saint Quentin en Yvelines - Université Paris Saclay, Unité
8	de Formation et de Recherche des Sciences de la Santé Simone Veil, 78180 Montigny-le-Bretonneux,
9	France.
10	2 Gunder de Diele de Médicale, Contra Hamitalian de Deiros Saint Comunin, 79200 Deiros Frances
11	2. Service de Biologie Medicale, Centre Hospitalier de Poissy-Saint Germain, 78300 Poissy, France.
13	3. Département de Biologie de la Reproduction, Cytogénétique, Gynécologie et Obstétrique, Centre
14	Hospitalier de Poissy-Saint Germain, 78300 Poissy, France.
15	
16	* to whom correspondence should be addressed at
17	EA 7404, Gamètes - Implantation - Gestation, 2 avenue de la Source de la Bièvre, Université de Versailles-
18	Saint Quentin en Yvelines - Université Paris Saclay, UFR des Sciences de la Santé Simone Veil, 78180
19	Montigny-le-Bretonneux
20	
21	
22	
23	
24	
25	
27	
28	Running title : Adiponectin involvement in histiotrophic nutrition

#### 29 Abstract

STUDY QUESTION: Does adiponectin influence the ability of endometrial stromal cells (ESCs) to
 produce, accumulate, and secrete glycogen towards the villous trophoblasts (VTs)?

SUMMARY ANSWER: Adiponectin inhibits glucose catabolism but promotes glycogen accumulation
 and secretion by human ESCs. Concomitantly, adiponectin restricts endometrial glycogen uptake by
 VTs.

35 WHAT IS KNOWN ALREADY: Throughout the entire first trimester of pregnancy, fetal growth is sustained by endometrial secretions, *i.e* histiotrophic nutrition. Under the influence of ovarian hormones, 36 37 ESCs accumulate and secrete a variety of nutritive molecules (including lipids, proteins and mostly glycogen) which are absorbed by trophoblastic cells and transmitted to the fetus. Glycogen appears to 38 have a critical role in the early stages of fetal development, since infertile women have low endometrial 39 glycogen levels. However, the molecular mechanisms underlying glycogen metabolism and trafficking 40 at the fetal-maternal interface have not yet been characterized. Among the various factors acting at the 41 fetal-maternal interface, we focused on adiponectin - an adipocyte-secreted cytokine involved in the 42 43 control of carbohydrate and lipid homeostasis.

STUDY DESIGN: Endometrial tissues were obtained during the implantation window, from 26 normally cycling women (aged 25 to 41) undergoing endometrial biopsy for a fertility evaluation. ESCs were isolated and cultured in the absence or presence of recombinant human adiponectin (25 ng/ml or 250 ng/ml). Endometrial glucose uptake, glucose catabolism, and glycogen accumulation and secretion were measured. Next, VTs were isolated from 12 healthy pregnant women (aged 18 to 42) undergoing legal abortion. Glycogen uptake and intracellular use were assessed using flow cytometry and confocal microscopy.

51 **MAIN RESULTS:** Our results clearly demonstrated that adiponectin controls glycogen metabolism 52 and trafficking in ESCs by (i) increasing glucose uptake *via* the upregulation of the glucose transporter 53 1 (ii) inhibiting glucose catabolism *via* a decrease in lactate and ATP productions (iii) increasing 54 glycogen synthesis, (iv) promoting glycogen accumulation *via* phosphoinositide-3 kinase activation, and (v) enhancing glycogen secretion. Furthermore, our results revealed that adiponectin significantly limits
glycogen endocytosis by human VTs. Lastly, we demonstrated that once glycogen has been endocytosed
into placental cells, it is degraded into glucose molecules in lysosomes.

LIMITATIONS: The assays were performed *in vitro* and therefore do not fully reflect the physiological
mechanisms. Moreover, placental uptake of glycogen was measured using a fluorescent structural
analog (FITC-dextran).

61 **IMPLICATIONS:** Taken as a whole, the present results demonstrate that adiponectin exerts a dual role 62 at the fetal-maternal interface by promoting glycogen synthesis in the endometrium and conversely 63 reducing trophoblastic uptake. We conclude that adiponectin may be involved in feeding the conceptus 64 during the first trimester of pregnancy by controlling glycogen metabolism in both the uterus and the 65 placenta.

FUNDING AND COMPETING INTERESTS: The study was funded by the Institut de Recherche en
Santé de la Femme based at the University of Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines and the Maternité
et Médecine de la Reproduction Association based at the CHI de Poissy-Saint-Germain-en-Laye. None
of the authors declared any conflict of interest.

- 70
- 71
- 72
- -
- 73
- 74
- 75
- 76

#### 77 Key words

<sup>78</sup> Adiponectin - Human endometrium - Human placenta - Histiotrophic nutrition - Glycogen trafficking

#### 80 Abbreviations

AAG: acid α-glucosidase; ADIPOR: adiponectin receptor; AEBSF: 4-(2-aminoethyl)-benzene-sulfonyl 81 fluoride; AMPK: AMP-activated protein kinase; BSA: bovine serum albumin; CM: conditioned 82 medium; DMEM/F12: Dulbecco's modified Eagle's medium and Ham F-12 nutrient mix; E2: 17β-83 estradiol; EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid; ESC: endometrial stromal cell; EEA-1: early 84 endosome antigen 1; FCS: fetal calf serum; FITC: fluorescein isothiocyanate; GLUT: glucose 85 86 transporter; GP: glycogen phosphorylase; GS: glycogen synthase; GSK3: glycogen synthase-kinase; LAMP-1: lysosome-associated membrane protein 1; P4: progesterone; PBS: phosphate buffer saline; 87 PI3K: phosphoinositide-3 kinase; RP13: Ribosomal Protein L13A; TBP: TATA-binding protein; ST: 88 syncytiotrophoblast; VT: villous trophoblast. 89

90

91

92

#### 93 Introduction

Efficient nutrient exchange between the mother and the fetus is essential for a successful 94 pregnancy and requires adequate placental development. The human placenta is a transient organ 95 96 composed of embryo-derived cells called trophoblasts. The syncytiotrophoblast (ST) is a specialized multinuclear syncytium located on the outer layer of placental villi. It is directly derived from villous 97 trophoblast (VT) fusion. The ST is crucial for nutrient and gas exchange, and displays an intense 98 endocrine activity (Lunghi et al., 2007). During the early stages of in utero development, the embryo is 99 nourished via a histiotrophic pathway in which nutritive uterine secretions (derived from endometrial 100 glands) are endocytosed by VT cells (Burton et al., 2002, 2007, 2011; Hempstock et al., 2004; Lambot 101 et al., 2006; Burke et al., 2013). 102

103 In the human uterus, nutrients accumulate in endometrial stromal cells (ESCs). During the 104 decidualization process, ESCs differentiate into decidual cells under the influence of ovarian hormones 17β-estradiol (E2) and progesterone (P4) (Irwin et al., 1989; Krenzer et al., 2006). ESCs are fibroblast-105 like cells that are able to accumulate and secrete lipids, proteins, and more notably glycogen (Dockery 106 107 et al., 1988; Hempstock et al., 2004). The endometrial production of glycogen seems to be critical for 108 embryo implantation, since infertile women reportedly have low endometrial glycogen levels (Maeyama 109 et al., 1977). Moreover, endometrial glycogen production increases throughout decidualization and peaks during the secretory phase corresponding to the implantation window (Mimori et al., 1981). 110 Studies performed in animal and human models have highlighted increases in the expression and activity 111 112 of enzymes involved in glycogenesis, such as glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), glycogen 113 synthase (GS) and glycogen phosphorylase (GP) (Salameh et al., 2006; Rose et al., 2011). However, little is currently known about glycogen trafficking from the endometrium to the placenta. Only three 114 studies suggest an exocytosis/endocytosis glycogen transport at the fetal-maternal interface, although 115 116 the details of glycogen use following endocytosis by the ST have not (to the best of our knowledge) been characterized (Burton et al., 2002, 2011; Jones et al., 2015). Various research results suggest that 117 endometrial proteins are endocytosed by placental cells and then degraded into amino-acids in 118 lysosomes. These amino-acids are then taken up by the placenta itself or transmitted to the fetus 119

(Hempstock et al., 2004). Moreover, glycogen vesicular transport has been demonstrated in several cell 120 types - especially in glycogen storage disorders like Pompe disease, which is characterized by 121 122 abnormally high glycogen accumulation (Maguire et al., 1983; Mancini et al., 1990; van der Ploeg and Reuser, 2008; Kaur and Debnath, 2015; Turner et al., 2015; Mony et al., 2016). More precisely, 123 vesicular glycogen can be carried from endosomes towards lysosomes, where it is degraded into glucose 124 by lysosomal enzyme, acid  $\alpha$ -glucosidase (AAG). Thereafter, glucose is exported from the lysosome to 125 the cytoplasm, where it enters the glycolysis pathway: this process is called glycophagy (Kaur and 126 127 Debnath, 2015). It can be hypothesized that endometrial glycogen follows this pathway and thus provides placental cells and/or the fetus with glucose. 128

129 Adiponectin is a 30 kDa protein that is predominantly but not exclusively produced by adipose tissue. It has an important role in regulating energy metabolism and has been described as an insulin-130 131 sensitizing hormone (Yamauchi et al., 2001; Fu et al., 2005). More precisely, adiponectin stimulates glucose assimilation in muscle cells, by increasing the translocation of glucose transporter isoform 4 132 (GLUT4) to the cell membrane (Ceddia et al., 2005). Adiponectin also upregulates fatty-acid transport 133 in muscle cells (Qiao et al., 2012). Moreover, adiponectin promotes the catabolism of carbohydrates and 134 lipids by enhancing the glycolysis and β-oxidation pathways (Yamauchi et al., 2002). In hepatocytes, 135 adiponectin inhibits lipogenesis, promotes  $\beta$ -oxidation, and reduces glycogenolysis and 136 137 gluconeogenesis (Combs and Marliss, 2014). Consequently, adiponectin significantly reduces 138 circulating glucose and triglyceride levels (Combs et al., 2001; Yamauchi et al., 2002; Karbowska and Kochan, 2006; Qiao et al., 2012). These effects seem to be mediated by the activation of the AMP-139 activated protein kinase (AMPK) pathway (Yamauchi et al., 2002). Furthermore, adiponectin reportedly 140 exerts anti-inflammatory, anti-angiogenic, anti-atherosclerotic, anti-proliferative, and pro-apoptotic 141 roles in various cell types (Yamauchi et al., 2003a; Dieudonne et al., 2006; Campos et al., 2008; Duval 142 143 et al., 2016). These effects are mediated by a variety of pathways, including the phosphoinositide-3 kinase (PI3K), the protein kinase A, and the mitogen-activated protein kinase pathways (Ouchi et al., 144 2000; Yamauchi et al., 2003b; Tilg and Moschen, 2006; Benaitreau et al., 2009). It is well known that 145

the AMPK and PI3K signal transduction pathways are both involved in glycogen metabolism in skeletal
muscle and in the liver (Ceddia *et al.*, 2005; Bultot *et al.*, 2012; Khorami *et al.*, 2015).

148 Some research results suggest that adiponectin is a key actor of the fetal-maternal interface dialogue (Benaitreau et al., 2009, 2010a, 2010b; Jones et al., 2010; Duval et al., 2016). It has been 149 reported that the adiponectin receptors, ADIPOR1 and ADIPOR2 (Yamauchi et al., 2003b), are 150 expressed in human endometrium and placenta (Takemura et al., 2006; Benaitreau et al., 2009). 151 Moreover, experiments performed in our laboratory clearly demonstrated that adiponectin favors the 152 development of a normal placenta with differentiative and anchoring abilities (Benaitreau et al., 2010a, 153 2010b). Interestingly, adiponectin exerts atypical metabolic effects in the human placenta. Using human 154 and murine models, we and others have shown that adiponectin downregulates glucose and amino-acid 155 transporters in placenta (Caminos et al., 2005; Jones et al., 2010; Rosario et al., 2012; Duval et al., 156 157 2016). We also demonstrated that adiponectin alters mitochondrial biogenesis but increases energy production in human VTs (Duval et al., 2016). 158

Furthermore, the adiponectin system has a critical role in uterine receptivity. Endometrial *ADIPOR* expression is abnormally low in infertile women and is at its highest during the implantation window in fertile women (Takemura *et al.*, 2006; Dos Santos *et al.*, 2012a). Furthermore, we recently observed that in contrast to the situation in human placenta, adiponectin exerts anti-differentiative and anti-invasive effects in human ESCs (Duval *et al.*, 2017).

164 Considering the importance of adiponectin in the control of glucose metabolism, we aimed to 165 study the *in vitro* effect of human recombinant adiponectin on glycogen synthesis and trafficking at the 166 human fetal-maternal interface. To this end, we studied (i) glucose uptake and metabolism leading to 167 glycogen accumulation in human ESCs and (ii) glycogen uptake and use in human VTs. Our results 168 contribute to a better understanding of histiotrophic nutrition in general and adiponectin involvement in 169 this pathway in particular.

#### **Materials and Methods**

#### 171 Materials

Dulbecco's Modified Eagle's Medium and Ham F-12 Nutrient Mix (DMEM/F12), progesterone, 17β-172 estradiol, penicillin, streptomycin, DNase type I, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), leupeptin, 173 aprotinin, 4-(2-aminoethyl)-benzene-sulfonyl fluoride (AEBSF), sodium fluoride (NaF), and bovine 174 serum albumin (BSA) were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Fetal calf serum 175 (FCS) was purchased from Gibco (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Recombinant human adiponectin 176 was provided by R&D Systems Europe Ltd (Abingdon, UK). Superscript III RNase H-RT and primers 177 were from Invitrogen and RNase inhibitor was obtained from AMRESCO (Solon, OH, USA). 178 Nucleospin RNA II kit was obtained from Machery-Nagel (Düren, Germany). Trypsin was provided by 179 180 Difco Laboratories (Detroit, MI, USA). Collagenase A was obtained from Boehringer (Mannheim, Germany). The suppliers of the various antibodies used in our experiments are described in the 181 corresponding sections below. 182

183

#### 184 Study population and tissue collection

Endometrial tissues were obtained during the implantation window. Patients with a low endometrial volume (<2 cm), submucous fibroma or polyps were excluded. Twenty-six normally cycling women (aged 25 to 41) undergoing endometrial biopsy for fertility evaluation were recruited into the study. First-trimester human placental tissues (4-10 week gestational age) were obtained from 12 healthy pregnant women (aged 18 to 42) undergoing legal abortions.

190

#### 191 **Ethical approval**

The present study was approved by the local investigational review board (*Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Médicale, approval reference protocol 01-78*). All
participants provided their written informed consent prior to tissue sampling.

195

196

#### 197 ESC culture

Human ESCs were isolated and cultured as previously described (Duval et al., 2017). Isolated ESCs 198 199 were characterized by positive staining for vimentin (95% stained positive) and negative staining for pancytokeratin (95% stained negative). Isolated ESCs are able to differentiate in vitro, when incubated 200 with E2 (10<sup>-8</sup> M) and P4 (10<sup>-6</sup> M), as shown by the progressive rise in prolactin secretion during the cell 201 culture period (Duval et al., 2017). After isolation, ESCs were cultured in phenol-red-free DMEM/F12 202 203 medium supplemented with streptomycin (10 µg/ml), penicillin (100 U/ml), and FCS (10%) at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> and 95% air atmosphere for 48 h. When the cells reached confluence, they were cultured in 204 differentiation medium (DMEM/F12 with E2 (10<sup>-8</sup> M), P4 (10<sup>-6</sup> M), charcoal-stripped FCS (2%), 205 penicillin (10 µg/ml), and streptomycin (100 U/ml)). This differentiation medium was supplemented or 206 not with human recombinant adiponectin (25 ng/ml or 250 ng/ml) for 15 days - the time required to 207 obtain fully differentiated decidual cells (Duval et al., 2017). The culture medium was renewed every 208 209 48 h.

210

#### 211 Reverse Transcription - Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

ESCs were seeded in 12-well culture plates  $(3.5 \times 10^5 \text{ cells per well})$ . After 3, 8, or 15 days of 212 differentiation (D3, D8, D15), total RNA ( $0.1 \mu g$ ) from ESCs was extracted and reverse-transcribed, as 213 previously described (Machinal-Quélin et al., 2002). Quantitative PCR was performed using the C1000 214 215 Thermal Cycler (CFX96 real-time system; BioRad, Hercules, CA, USA) and the primers sets indicated in Table 1. Three reference genes coding for ribosomal protein L13A (RP13), TATA box-binding 216 protein (TBP) and  $\beta$ 2-microglobulin were chosen as previously described (Benaitreau *et al.*, 2009). Data 217 were analysed using BioRad CFX Manager software (version 3.0) and expressed in arbitrary units, as 218 219 previously described (Duval et al., 2016).

220

#### 221 Immunoblotting

ESCs were seeded onto 6-well culture plates  $(2.0 \times 10^6 \text{ cells per well})$  and lysed on ice in buffer containing Tris (50 mM), NaCl (120 mM), EDTA (1 mM), Nonidet-P40 (1%), deoxycholate (0.1%), SDS (0.1%), sodium vanadate (1 mM),  $\beta$ -glycerophosphate (30 mM), aprotinin (5 µg/ml), leupeptin (12.5 µg/ml), AEBSF (100 µg/ml), sodium fluoride (10 mM). 20 µg of proteins were resolved by SDSPAGE (4-20% acrylamide) and transferred onto nitrocellulose membranes using a wet transfer method.
After transfer, membranes were incubated overnight with the primary antibodies described in Table 2.
After washing, the membranes were incubated with peroxidase-coupled secondary antibody for 1 h at
room temperature. The blots were developed using the SuperSignal<sup>TM</sup> West Pico Chemiluminescent
Substrate (ThermoFisher Scientist Inc., Waltham, MA, USA).

231

#### 232 Glucose uptake

Glucose uptake by ESCs was estimated by measuring the glucose levels in cell supernatant after 3, 8,
and 15 days of differentiation (D3, D8, and D15), using an automated enzyme assay (Roche, Basel,
Switzerland). More precisely, we considered that low glucose concentrations in the incubation medium
corresponded to high glucose uptake by ESCs. Glucose levels were normalized per µg of total proteins,
measured using Bradford method, with BSA as the standard.

238

#### 239 Lactate production

Lactate release into the culture medium by ESCs was measured using an automated enzyme assay
(Roche, Basel, Switzerland) after 15 days of cell culture. The level was normalized per μg of total
proteins as described above.

243

#### 244 **ATP production**

Cellular ATP production was measured using a dedicated assay kit (ab83355, Abcam, Paris, France),
according to the manufacturer's instructions.

247

#### 248 Glycogen accumulation

Intracellular and extracellular glycogen accumulation were measured using a dedicated assay kit
(MAK016, Sigma, St Louis, MO, USA), according to the manufacturer's instructions.

251

252

#### 253 Endometrial glycogen transport from ESCs to VTs

VTs were prepared from tips of placental villi as previously described (Handschuh et al., 2007). VTs 254 were seeded in a 12-well culture plate ( $1.5 \times 10^6$  cells per well) and cultured in a phenol-red free 255 DMEM/F12 medium supplemented with streptomycin (10 µg/ml), penicillin (100 U/ml), and FCS 256 (10%) at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> and 95% air atmosphere, for 24 h. On the next day, VTs were treated with 257 conditioned medium (CM) from 15-day-decidualized ESCs treated or not with human recombinant 258 adiponectin (25 ng/ml or 250 ng/ml). Media from non-decidualized ESCs were used as controls. After 259 260 48 h, glycogen accumulation in placental cells was assayed, as described above. The VTs were cultured for a total of 72 h - the time needed to obtain a functional ST (Benaitreau et al., 2010b; Poidatz et al., 261 2015; Duval et al., 2016). 262

263

#### 264 Confocal microscopy analysis of fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran absorption by VTs

The polysaccharide dextran has much the same structure as glycogen and is therefore used as a glycogen 265 analog for in vitro studies (Simionescu et al., 1972; Takikita et al., 2009). VTs were seeded in a Labtech 266 culture device (1.0  $\times$  10<sup>5</sup> cells per well) and cultured in a phenol-red free DMEM/F12 medium 267 supplemented with streptomycin (10 µg/ml), penicillin (100 U/ml), and FCS (10%) at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> 268 and 95% air atmosphere, for 24 h. Next, VTs were cultured in DMEM/F12 medium supplemented with 269 270 FCS (1%) for 48 h. VTs were exposed to FITC-dextran (Sigma, St Louis, MO, USA) for 30 min, 1 h, 2 271 h, 3 h, 4 h, and 6 h at 37°C. Next, the cells were fixed in paraformaldehyde (4%) for 30 min at room temperature and washed with phosphate buffer saline (PBS) for 45 min before counterstaining of the 272 cell nuclei with 1 µg/ml Hoechst 33258 reagent (Sigma). The fluorescence was visualized using an 273 inverted laser scanning confocal microscope (Leica white light laser TCS SP8-X, Leica Microsystem, 274 275 Wetzlar, Germany). Five cell events per condition were randomly selected and the FITC-dextran 276 intensity (in arbitrary units) was estimated using the post-imaging procedure in ImageJ software. These 277 experiments were designed to select the most efficient FITC-dextran exposure time for the VTs.

- 278
- 279
- 280

#### 281 Flow cytometry analysis of FITC-dextran absorption by VTs

VTs were seeded in 12-well culture plates  $(1.5 \times 10^6 \text{ cells per well})$  and cultured in a phenol-red free 282 283 DMEM/F12 medium supplemented with streptomycin (10 µg/ml), penicillin (100 U/ml), and FCS (10%) at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> and 95% air atmosphere for 24 h. Next, VTs were cultured in DMEM/F12 284 medium and FCS (1%) supplemented or not with human recombinant adiponectin (25 ng/ml or 250 285 ng/ml) for 48 h. Next, cells were stained with FITC-dextran for 2 h at 37°C. Flow cytometry analysis 286 was performed using an imaging flow cytometer LSR Fortessa (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). 287 100,000 events per condition were acquired and mean fluorescence of FITC-positive cells were 288 quantified using BD FACSDiva software. 289

290

#### 291 Intracellular trafficking of FITC-dextran in VTs

To visualize the intracellular localization of FITC-dextran, immunofluorescence experiments were 292 performed. Early endosome antigen 1 (EEA-1) and lysosome-associated membrane protein 1 (LAMP-293 1) immunostainings were used to localize endosomes and lysosomes, respectively. VTs were 294 295 permeabilized for 5 min with PBS-triton (0.2%). Non-specific binding was prevented by incubation in PBS with BSA (3%) for 1 h at room temperature. VTs were incubating overnight with anti-EEA-1 (1:50, 296 sc-137130, Santa Cruz Biotechnologies, Inc., CA, USA) or for 1 h with anti-LAMP-1 (1:50, sc-20011, 297 Santa Cruz Biotechnologies, Inc., CA, USA). Cells were then rinsed with PBS and incubated with an 298 299 Alexa-647-conjugated, goat-anti-mouse secondary antibody (1:200, Amax/Emax: 650/665, A-21236, Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) for 1 h at room temperature. 300 Immunostained samples were observed using an inverted laser scanning confocal microscope (Leica 301 white light laser TCS SP8-X; Leica Microsystems). Co-localization between FITC-dextran and 302 endosomes or lysosomes were assessed by measuring Pearson's coefficient, using the ImageJ software. 303

304

#### 305 Statistics

306 Statistical analysis was performed on the raw data from 5 to 10 separate experiments and compared with 307 control values (*i.e* in the absence of adiponectin) at D3, D8, and D15 in an analysis of variance 308 (ANOVA) with Bonferroni p-value correction. A non-parametric, paired Wilcoxon test was used to

- assess (i) the effect of the adiponectin concentration (25 ng/ml or 250 ng/ml) with the control situation
- 310 (the absence of adiponectin) for a given day of exposure and (ii) the time course of FITC-dextran co-
- 311 localization with endosomes or lysosomes.

#### 312 **Results**

# Effect of adiponectin on glucose transporter mRNA expression and glucose uptake in human ESCs

We investigated the effect of adiponectin (25 ng/ml or 250 ng/ml) on mRNA expression levels of the 315 glucose transporter isoforms 1 and 3 (GLUT1 and GLUT3) in ESCs during decidualization. The GLUT1 316 mRNA expression level increased throughout the decidualization process (4.6-fold higher at D15 of cell 317 318 culture relative to D3) (Figure 1A). We found that adiponectin (25 ng/ml) accentuated the increase in GLUT1 mRNA expression (+ 54% and + 49 % at D8 and D15, respectively). Similarly, a significant 319 increased GLUT1 mRNA expression was observed in presence of 250 ng/ml adiponectin (+ 94%, + 320 321 170%, and + 129% at D3, D8, and D15, respectively). The opposite expression profile was observed for GLUT3 mRNA expression: in the absence of adiponectin, levels of GLUT3 mRNA expression fell 322 during decidualization (3.1-fold lower at D15 of cell culture relative to D3). Furthermore, neither of the 323 two adiponectin concentrations affected the GLUT3 mRNA expression level at any time point (Figure 324 325 **1B**).

In parallel, we assessed adiponectin effect on glucose uptake by ESCs. To this end, we measured the glucose levels in cell supernatants on D3, D8, and D15 of decidualization (**Figure 1C**). Our results showed that adiponectin (25 ng/ml) was associated with significantly lower glucose levels in supernatants (- 19%) at D15 only. However, glucose levels were significantly lower at all time points in the presence of 250 ng/ml adiponectin (- 9%, - 17%, and - 21%, at respectively D3, D8, and D15). Taken as a whole, these results suggest that adiponectin increases glucose uptake by ESCs.

332

#### 333 Effect of adiponectin on glucose catabolism in human ESCs

In order to determine how decidualized ESCs use the glucose in the presence of adiponectin, we quantified the cellular ATP levels and lactate release into the cell supernatant. Firstly, we compared cellular ATP levels in undifferentiated (D0) and differentiated (D15) ESCs. In the absence of adiponectin, we did not observe any significant difference in ATP production between D0 and D15 (67.4  $\pm 2.8 \mu$ M and  $80.6 \pm 12.2 \mu$ M, respectively) (data not shown). However, incubation with adiponectin was associated with lower cellular ATP levels on D15 (- 32% and - 34% for 25 ng/ml and 250 ng/ml,
respectively) (Figure 2A). Secondly, we also observed that the presence of adiponectin was associated
with significantly lower lactate production by ESCs after 15 days of culture (- 46% for the two doses
tested) (Figure 2B).

343

#### 344 Effect of adiponectin on glycogen synthesis by human ESCs

345 As adiponectin did not seem to direct glucose towards anaerobic or aerobic glycolysis, we sought to 346 determine its potential role in glycogen synthesis in human ESCs. We therefore studied the expression of the main enzymes involved in glycogen hydrolysis (GP) and glycogen synthesis from glucose (GS). 347 In the absence of adiponectin, the GS and GP mRNA expression levels did not change significantly 348 during the ESC decidualization (data not shown). However, when ESCs were treated with adiponectin 349 for 15 days, we observed significantly higher levels of GS mRNA expression (+ 71% and + 56% for 25 350 ng/ml and 250 ng/ml, respectively) (Figure 3A). In contrast, we did not observe any effect of 351 adiponectin on GP mRNA expression at either concentration (Figure 3B). In parallel, we measured 352 glycogen accumulation in ESCs on D15 of decidualization. Only 250 ng/ml adiponectin was associated 353 with greater glycogen accumulation (+ 34% relative to control) (Figure 3C). 354

355

#### 356 Effect of adiponectin on AMPK and PI3K activation in human ESCs

Our results suggested that adiponectin promotes glycogen synthesis and conversely, blocks glucose 357 358 catabolism in human ESCs. Hence, we now sought to specify the signaling pathways involved in these adiponectin effects. Activation of AMPK and PI3K was evaluated by measuring the phosphorylation on 359 the Thr-172 residue of AMPKα and on the Ser-9 residue of GSK3β, respectively. As shown in Figure 360 4A-B, we observed that adiponectin-treated ESCs presented a lower phospho-AMPKa/total-AMPKa 361 362 ratio at D15 (- 19% and - 25% for 25 ng/ml and 250 ng/ml, respectively) than non-treated ESCs. In parallel, a higher phospho-GSK3β/total-GSK3β ratio was observed (+ 69% for 250 ng/ml adiponectin) 363 (Figure 4C-D). 364

365

366

#### Signaling pathways involved in adiponectin regulation of glycogen accumulation in human ESCs 367 To confirm the molecular mechanisms underlying adiponectin effects on glycogen accumulation in 368 369 human ESCs, we performed experiments with Compound C and LY294002, selective inhibitors of AMPK and PI3K, respectively (Figure 5). Since AMPK and PI3K are key components of two major 370 transduction pathways in glycogen metabolism, it is not surprising that both inhibitors exerted a 371 significant effect on glycogen accumulation. A significant increase (+ 42% relative to the control) and 372 a significant reduction (- 32% relative to the control) in endometrial glycogen accumulation were 373 effectively observed in the presence of Compound C and LY294002, respectively. As previously shown 374 in Figure 3C, adjponectin enhanced glycogen accumulation (+ 34% relative to the control). This increase 375 persisted in the presence of Compound C (+ 45% relative to the control) but was abrogated by treatment 376 with LY294002 (- 19% relative to control). 377

378

#### 379 Effect of adiponectin on glycogen secretion by human ESCs

We next sought to specify adiponectin effect on glycogen secretion by ESCs. To this end, we quantified glycogen release into the cell supernatant in the presence or absence of adiponectin (**Figure 6**). Compared with the control situation, adiponectin increased glycogen secretion by ESCs (+ 92% and + 167% for 25 ng/ml and 250 ng/ml, respectively). We also observed that ESCs not exposed to E2 and P4 treatment (*i.e* non-decidualized ESCs) secreted significantly lower amounts of glycogen (- 61% relative to the control).

386

#### 387 Effect of adiponectin on glycogen uptake by human VTs

As illustrated in **Figure 7A-B**, glycogen and dextran molecules are highly similar. Hence, we used FITC-dextran to study glycogen accumulation in VTs. In confocal microscopy experiments, we confirmed that (i) VTs accumulated dextran at the concentrations described in the literature (*i.e* 1 mg/ml) and (ii) polysaccharide uptake by VTs appears to be optimal after 2 h of VT incubation with FITCdextran (**Figure 7C**). Next, VTs were cultured in the presence of adiponectin (25 ng/ml or 250 ng/ml) for 48 h and then exposed to FITC-dextran (1 mg/ml) for the last 2 h. As shown in **Figure 7D**, flow cytometry experiments showed that the mean FITC-dextran fluorescence intensity was significantly
lower in VTs exposed to adiponectin (- 18% for both concentrations of adiponectin, relative to control).

#### 397 Influence of conditioned medium from decidualized ESCs on glycogen accumulation by VTs

In order to demonstrate that the endometrial glycogen secreted by ESCs was captured by placental cells, 398 VT cultures were performed using conditioned medium (CM) from non-decidualized ESCs (i.e ESCs 399 400 cultured in the absence of E2 and P4) and from 15-day-decidualized ESCs treated or not with adiponectin (Figure 8A). Firstly, we observed that VTs cultured with CM from decidualized ESCs, 401 accumulated higher glycogen quantities (+ 48%) than those cultured with medium from non-402 decidualized ESCs (Figure 8B). Secondly, we demonstrated that medium enriched in glycogen (i.e 403 conditioned by adiponectin-treated ESCs) increased glycogen accumulation in VTs (+ 16% and + 12% 404 for 25 ng/ml and 250 ng/ml, relative to control). 405

406

#### 407 Intracellular transport of glycogen in human VTs

408 Lastly, we used confocal microscopy to study the intracellular localization of FITC-dextran following absorption by VTs. We determined whether FITC-dextran co-localized with endosomes by monitoring 409 the endosomal marker EEA-1. When VTs were cultured in the presence of FITC-dextran for a relatively 410 short time (30 min) we noticed a strong positive association between FITC-dextran and the EEA-1 411 412 protein (Figure 9A-C). However, this association seemed to weaken when VTs were exposed to FITCdextran for a longer time as shown in Figure 9D-F for 2 h of exposure and Figure 9G-I for 6 h of 413 exposure. Next, we studied FITC-dextran co-localization with lysosomes by monitoring the LAMP-1 414 marker. For exposure times below 2 h, we observed weak co-localization of dextran and lysosomes 415 416 (Figure 10 A-C). Thereafter, the degree of co-localization strengthened, as shown in Figure 10 D-F for 4 h of exposure and Figure 10 G-I for 6 h of exposure. Calculation of Pearson's coefficient showed that 417 the association between EEA-1 and FITC-dextran became significantly weaker over time (Figure 11A). 418 Conversely, the association between LAMP-1 and FITC-dextran became stronger over time (Figure 419 **11B**). 420

#### 421 **Discussion**

422 For many years, the endometrium (like the uterus in general) was considered to be an inert organ whose 423 sole function was to support the developing fetus. However, a large body of data clearly now show that 424 the endometrium has a critical role in the establishment of a successful pregnancy. More particularly, ESCs accumulate and secrete large amounts of nutritive molecules (such as proteins, lipids, and 425 426 glycogen) and provide histiotrophic nutrition to the fetus via endocytosis by the ST (Burton et al., 2007). 427 Endometrial glycogen seems to have a crucial role in the early stages of pregnancy. Indeed, it has been reported that endometrial glycogen levels are lower in infertile women than in fertile women (Maeyama 428 429 et al., 1977). In order to better understand glycogen metabolism at the fetal-maternal interface, we 430 studied the effects of adiponectin (a key actor of paracrine dialogue at the interface) on (i) glucose uptake 431 and catabolism and (ii) glycogen accumulation and secretion in human endometrial cells. We also assessed adiponectin effects on glycogen uptake by human trophoblastic cells. In the present study, 432 human recombinant adiponectin had effects at concentrations of 25 ng/ml and 250 ng/ml which are 433 much lower than those normally found in the main circulation or in cord blood during pregnancy 434 435 (Kajantie et al., 2004; Corbetta et al., 2005). However, the human recombinant adiponectin used in the 436 present study corresponds mainly to the high molecular weight form (Bub et al., 2006), which is known to be the active form of adiponectin (Kobayashi et al., 2004). Moreover, adiponectin is commonly used 437 in *in vitro* experiments with endometrial, placental and other cell types at these sub-physiological 438 439 concentrations (Brakenhielm et al., 2004; Benaitreau et al., 2009, 2010a, 2010b; Bohlouli et al., 2013; Duval et al., 2016, 2017). 440

In a first set of experiments, we studied glucose uptake by human ESCs. In the absence of adiponectin, we observed a major increase over time in mRNA expression of glucose transporter GLUT1 during cell differentiation. Surprisingly, mRNA expression levels of GLUT3 (another glucose transporter isoform expressed in human endometrium) decreased slightly during ESC differentiation. These results suggest that GLUT1 becomes the major isoform in fully differentiated ESCs, as previously described in human endometrial and decidual tissues during the menstrual cycle (Strowitzki *et al.*, 2001; Krzeslak *et al.*, 2012).
In parallel, we studied adiponectin effects on glucose uptake and use by ESCs. Our results clearly 448 demonstrated that adiponectin promotes glucose uptake by upregulating GLUT1 mRNA expression 449 without affecting GLUT3 mRNA expression. Moreover, we showed that exposure to adiponectin was 450 associated with a significant decrease in the activity of catabolic glucose pathways (anaerobic and 451 aerobic glycolysis) and conversely, a relative increase in glucose anabolism (by directly inducing GS 452 mRNA expression, the rate limiting enzyme in glycogen synthesis). These results suggest that 453 adiponectin has a broader range of effects on glucose metabolism in ESCs than in hepatocytes, a well-454 455 characterized cell target in which adiponectin specifically controls glycogenolysis and gluconeogenesis (Combs and Marliss, 2014). 456

Our results also demonstrated that adiponectin favors the accumulation of glycogen in ESCs. To gain 457 insight into the molecular mechanisms involved in glycogen accumulation in response to adiponectin, 458 459 we investigated the adiponectin two main pathways. Firstly, our results revealed that adiponectin is able to stimulate PI3K and inversely to inhibit AMPK, suggesting that both ADIPOR1 and ADIPOR2 are 460 functional in ESCs. Secondly, the results of experiments with specific inhibitors demonstrated that 461 adiponectin promotes glycogen storage specifically via the PI3K transduction pathway. Hence, we can 462 hypothesize that AMPK signaling is involved in other physiological effects of adiponectin such as 463 endometrial glucose catabolism. Further experiments are underway in our laboratory. 464

Glycogen secretion by ESCs during in vitro decidualization was also studied. We found that glycogen 465 secretion appears to depend on the ESC decidualization status since ESCs cultured in the absence of E2 466 467 and P4 secreted less glycogen than fully decidualized ESCs. These data confirm and complete several previous studies performed with endometrial glands demonstrating that glycogen content is associated 468 with decidualization status (Salameh et al., 2006; Rose et al., 2011; Dean et al., 2014; Filant and 469 470 Spencer, 2014). Moreover, we showed that ESCs treated with adiponectin secreted significantly higher 471 amounts of glycogen than non-treated cells. Taken as a whole, our results clearly demonstrated that adiponectin has a pivotal role in the control of endometrial glycogen metabolism. 472

We next sought to establish whether placental cells are able to take up endometrial glycogen. To thisend, VTs were plated in the presence of CM from ESCs cultured in the presence or in the absence of

adiponectin. We clearly demonstrated that VTs treated with glycogen-enriched medium (i.e CM from 475 adiponectin-treated ESCs) accumulate greater amounts of glycogen in their cytoplasm than VTs treated 476 477 with low-glycogen medium (i.e CM from ESCs not treated with adiponectin or ESCs not treated with E2 and P4). These results suggest that VT glycogen uptake (i) depends on the amount of glycogen in 478 the extracellular medium and (ii) seems to be controlled by adiponectin. In fact, our experiments 479 performed with FITC-dextran revealed that adiponectin directly controls trophoblast glycogen uptake. 480 Adiponectin can also indirectly control this process by stimulating the secretion of endometrial factors. 481 482 Epidermal growth factor seems to be a good candidate since it is secreted by ESCs and is known to increase glycogen uptake by hepatocytes (Freemark, 1986; Burton et al., 2007). 483

Lastly, we found that internalized glycogen co-localized first with endosomes and then with lysosomes. The latter results are in line with the literature data on the trafficking of macromolecules (including glycogen) between decidual glands and trophoblasts (Jones *et al.*, 2015). Hence, we can hypothesize that after placental endocytosis, endometrial glycogen is degraded (like proteins) in lysosomes. The newly formed glucose molecules are probably used by VTs for their own metabolic needs or transmitted to the fetus *via* the histiotrophic nutrition pathway. Further experiments will be needed to confirm this hypothesis and to specify adiponectin roles in placental glycophagy.

In conclusion, our present results show that adiponectin promotes glycogen synthesis, accumulation and 491 secretion by human ESCs. However, adiponectin also slows down glycogen entry into human VTs, 492 suggesting that adiponectin downregulates the placenta uptake of nutrients through the histiotrophic 493 494 nutrition pathway. Indeed, we and others have reported that adiponectin inhibits nutrient transporters expression in the first-trimester and third-trimester human placenta as well as in the murine placenta 495 (Caminos et al., 2005; Jones et al., 2010; Aye et al., 2014; Duval et al., 2016). Interestingly, opposite 496 497 effects of adiponectin in the endometrium and the placenta have been already described. Indeed, we 498 found that adiponectin induces pro-invasive effects in human VTs (Benaitreau et al., 2010b) but antiinvasive effects in human ESCs (Duval et al., 2017). Furthermore, we demonstrated that adiponectin 499 promotes aerobic glycolysis and ATP synthesis in human placental cells (Duval et al., 2016). In the 500 501 present study, we found that adiponectin had the opposite effect in human ESCs. Moreover, adiponectin has pro-inflammatory effects in the endometrium and anti-inflammatory effects in the placenta (Lappas *et al.*, 2005; Takemura *et al.*, 2006).

Studies performed in our laboratory revealed that adiponectin exerts pro-differentiative, pro-invasive, and pro-apoptotic effects in human placental cells and conversely, anti-differentiative and anti-invasive effects in human ESCs. Our work highlighted a novel effect of adiponectin in both cell types. Taken as a whole, our present data suggest that this adipokine is a major actor at the fetal-maternal interface. Thus, dysfunctional adiponectin signaling (due to a low endometrial ADIPOR expression, for example) might jeopardize a successful pregnancy - as we have shown previously in sour study of endometrial tissue from women with unexplained recurrent implantation failure (Dos Santos et al., 2012b). The role of adiponectin in glycogen metabolism and trafficking at the fetal-maternal interface during the first trimester of pregnancy is summarized in Figure 12. 

- ---

# 526 **Conflict of interest**

527 The authors declared no conflict of interest.

528

# 529 Funding

This work was funded by the Institut de Recherche en Santé de la Femme, based at the UFR des Sciences
de la Santé, University of Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines and the Maternité et Médecine de la
Reproduction Association, based at the CHI de Poissy-Saint-Germain-en-Laye.

533

# 534 Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the staff at the Department of Gynecology and Obstetrics at CHI de Poissy-Saint-Germain-en-Laye for kindly providing human endometrial and placental tissues. Immunofluorescence image acquisition and analysis were performed at the CYMAGES facility, supported by the Saint-Quentin-en-Yvelines Urban Community and the University of Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines. We thank Julien Tardieu for technical support.

540

# 541 Authors' roles

F.D. and M.N.D. designed the experiments. F.D. performed the experiments. F.D. and M.N.D. analyzed
the data. F.D., M.N.D., and E.D.S. wrote the manuscript. K.F. provided human endometrial biopsies and
placenta tissues for experiments. V.S. performed automated assays. B.M contributed to analyze the
confocal data. F.V. obtained research funding and critically revised the manuscript.

# 547 Legends

548

#### 549 Figure 1 - Adiponectin increases glucose uptake by ESCs throughout decidualization

Human ESCs were cultured in DMEM/F12 medium supplemented with E2 and P4. (A-B) Total RNA 550 was extracted after three (D3), eight (D8), and 15 days (D15) of cell decidualization. GLUT1 and 551 552 GLUT3 mRNA expression levels were quantified by RT-qPCR, as described in the Materials and Methods section. The data are quoted as the mean  $\pm$  SEM of nine separate experiments. A. GLUT1 553 mRNA expression. B. GLUT3 mRNA expression. C. The glucose level in the supernatant was measured 554 555 in supernatant, after three (D3), eight (D8), and 15 days (D15) of cell decidualization. The data are guoted as the mean  $\pm$  SEM of six separate experiments. The control values were  $14.31 \pm 1.63$  mmol/µg 556 protein at D3,  $18.40 \pm 1.28$  mmol/µg protein at D8, and  $16.51 \pm 1.26$  mmol/µg protein at D15. \*: p<0.05; 557 \*\*: p<0.01; NS: non-significant. (a) vs. a control experiment in the absence of adiponectin. Wilcoxon 558 test. (b) vs. D3. (c) vs. D8. ANOVA test. 559

560

### 561 Figure 2 - Adiponectin decreases glucose catabolism in ESCs

Human ESCs were cultured in DMEM/F12 medium supplemented with E2 and P4. A. Total ATP production was determined after 15 days (D15) of cell decidualization. The data are quoted as the mean  $\pm$  SEM of eight separate experiments. The control value was 80.59  $\pm$  12.17  $\mu$ M ATP. B. Lactate production was measured after 15 days (D15) of cell decidualization. The data are quoted as the mean  $\pm$  SEM of six separate experiments. The control value was 2.08  $\pm$  0.66 mmol/ $\mu$ g protein. \*: p<0.05. Wilcoxon test.

568

#### 569 Figure 3 - Adiponectin promotes glycogenesis in ESCs

Human ESCs were cultured in DMEM/F12 medium supplemented with E2 and P4. (A-B) Total RNA
was extracted after 15 days (D15) of cell decidualization. mRNA expression levels of GS and GP were
quantified by RT-qPCR, as described in Materials and Methods section. The data are quoted as the mean
± SEM of nine separate experiments. A. GS mRNA expression. B. GP mRNA expression. C.
Intracellular glycogen accumulation was determined after 15 days (D15) of cell decidualization. The

data are quoted as the mean  $\pm$  SEM of six separate experiments. The control value was 0.91  $\pm$  0.08 576  $\mu$ g/ $\mu$ l. \*: p<0.05; NS: non-significant. Wilcoxon test.

577

#### 578 Figure 4 - Adiponectin regulates glucose metabolism pathways in ESCs

Human ESCs were cultured in DMEM/F12 medium supplemented with E2 and P4. Total protein was 579 extracted after 15 days (D15) of cell decidualization A. Cell extracts were prepared and immunoblotted 580 for phospho-AMPKa (Thr-172) and total-AMPKa. The figure represents one of five separate 581 experiments. B. phospho-AMPKa (Thr-172) and total-AMPKa were quantified by immunoblotting as 582 described in the Materials and Methods section. To evaluate AMPK activation, the phospho-583 AMPKa/total-AMPKa ratio was calculated. C. Cell extracts were prepared and immunoblotted for 584 phospho-GSK3β (Ser-9) and total-GSK3β. The figure represents one of five separate experiments. B. 585 phospho-GSK3ß (Ser-9) and total-GSK3ß were quantified by immunoblotting as described in the 586 Materials and Methods section. To evaluate PI3K activation, the phospho-GSK3B/total- GSK3B ratio 587 was calculated. The data are quoted as the mean  $\pm$  SEM of five separate experiments. \*: p<0.05; NS: 588 589 non-significant. Wilcoxon test.

590

#### 591 Figure 5 - Adiponectin activates ESC glycogen accumulation *via* PI3K pathway

Human ESCs were cultured in DMEM/F12 medium supplemented with E2 and P4. ESCs were exposed to the AMPK inhibitor Compound C (10<sup>-6</sup> M) or the PI3K inhibitor LY294002 (10<sup>-6</sup> M) in the presence or absence of adiponectin (250 ng/ml), as described in the Materials and Methods section. Intracellular glycogen accumulation was determined after 15 days (D15) of cell decidualization. The data are quoted as the mean  $\pm$  SEM of six separate experiments. The control value was 0.91  $\pm$  0.08  $\mu$ g/ $\mu$ l. \*: p<0.05; NS: non-significant. (a) *vs.* a control experiment in the absence of adiponectin. (b) *vs.* 250 ng/ml adiponectin. Wilcoxon test.

599

### 600 Figure 6 - Adiponectin enhances glycogen secretion by ESCs

Human ESCs were cultured in DMEM/F12 medium supplemented with E2 and P4. Extracellular
glycogen secretion was measured in cell supernatants after 15 days (D15) of cell decidualization. The

603 data are quoted as the mean  $\pm$  SEM of eight separate experiments. The control value was  $0.28 \pm 0.03$ 604  $\mu g/\mu l. *: p<0.05$ . Wilcoxon test.

605

#### 606 Figure 7 - Adiponectin decreases FITC-dextran uptake by VTs

A. The structure of glycogen. B. The structure of dextran. C. Human VTs were cultured in DMEM/F12 medium. VTs were incubated with FITC-dextran as described in the Materials and Methods section. FITC-dextran absorption was analyzed by confocal microscopy. Magnification  $\times$  40. The figure represents one of three separate experiments. a. 30-minute incubation. b. 1-hour incubation. c. 2-hour incubation. d. 4-hour incubation. D. Quantification of FITC-dextran absorption by VTs. The data are quoted as the mean ± SEM of ten separate experiments. \*: p<0.05. Wilcoxon test.

613

# Figure 8 - VTs take up greater amounts of glycogen in the presence of medium from decidualized ESCs

A. Human VTs were cultured in the presence of conditioned medium (CM) from 15-day-decidualized ESCs treated or not with adiponectin (25 ng/ml or 250 ng/ml). As a negative control, VTs were cultured in the presence of CM from non-decidualized ESCs (*i.e* cultured without E2 and P4). B. After 48 h, intracellular glycogen accumulation in VTs was measured. The data are quoted as the mean  $\pm$  SEM of ten separate experiments. The control value was  $0.77 \pm 0.13 \mu g/\mu l. *: p<0.05$ . Wilcoxon test.

621

#### 622 Figure 9 - FITC-dextran co-localizes with a placental endosomal marker

Human VTs were cultured in DMEM/F12 medium. After 48 h, absorption of FITC-dextran was initiated as described in the Materials and Methods section and analyzed using confocal microscopy. VTs were fixed and stained for EEA-1. (A,D,G) FITC-dextran staining. (B,E,H) EEA-1 staining. (C,F,I) Superposition of the two staining patterns. The figure represents one of six separate experiments. Magnification  $\times$  40.

- 628
- 629
- 630

631	Figure 10 - FITC-dextran co-localizes with a placental lysosomal marker
632	Human VTs were cultured in DMEM/F12 medium. After 48 h, absorption of FITC-dextran was intiated
633	as described in the Materials and Methods section and analyzed using confocal microscopy. VTs were
634	fixed and stained for LAMP-1. (A,D,G) FITC-dextran staining. (B,E,H) LAMP-1 staining. (C,F,I)
635	Superposition of the two staining patterns. The figure represents one of six separate experiments.
636	Magnification $\times$ 40.
637	
638	Figure 11 - FITC-dextran is absorbed by endocytosis and directed to the lysosomes in placental
639	cells
640	Using data from Figure 9 and Figure 10, Pearson's coefficient was calculated in order to demonstrate
641	the association between FITC-dextran, endosomes and lysosomes. A. Pearson's coefficient for FITC-
642	dextran and EEA-1. B. Pearson's coefficient for FITC-dextran and LAMP-1.
643	
644	Figure 12 - Hypothetical mechanism by which adiponectin controls glycogen metabolism and
645	trafficking at the fetal-maternal interface
646	GS : glycogen synthase; $\bowtie$ : downregulation; $\nearrow$ : upregulation; ? : unknown effect

# 648 **References**

- Aye ILMH, Gao X, Weintraub ST, Jansson T, Powell TL. Adiponectin inhibits insulin function in
   primary trophoblasts by PPARα-mediated ceramide synthesis. *Mol Endocrinol* [Internet]
   2014;28:512–524.
- Benaitreau D, Dieudonné M-N, Santos E Dos, Leneveu M-C, Mazancourt P de, Pecquery R.
   Antiproliferative effects of adiponectin on human trophoblastic cell lines JEG-3 and BeWo. *Biol Reprod* [Internet] 2009;80:1107–1114.
- Benaitreau D, Santos E Dos, Leneveu M-C, Alfaidy N, Feige J-J, Mazancourt P de, Pecquery R,
  Dieudonné M-N. Effects of adiponectin on human trophoblast invasion. *J Endocrinol* [Internet]
  2010a;207:45–53.
- Benaitreau D, Santos E Dos, Leneveu M-C, Mazancourt P De, Pecquery R, Dieudonné M-N.
   Adiponectin promotes syncytialisation of BeWo cell line and primary trophoblast cells. *Reprod Biol Endocrinol* [Internet] 2010b;8:128.
- Bohlouli S, Khazaei M, Teshfam M, Hassanpour H. Adiponectin effect on the viability of human
  endometrial stromal cells and mRNA expression of adiponectin receptors. *Int J Fertil Steril*[Internet] 2013;7:43–48.
- Brakenhielm E, Veitonmaki N, Cao R, Kihara S, Matsuzawa Y, Zhivotovsky B, Funahashi T, Cao Y.
   Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated
   endothelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci* [Internet] 2004;101:2476–2481.
- Bub JD, Miyazaki T, Iwamoto Y. Adiponectin as a growth inhibitor in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet] 2006;**340**:1158–1166.
- Bultot L, Guigas B, Wilamowitz-Moellendorff A Von, Maisin L, Vertommen D, Hussain N, Beullens
   M, Guinovart JJJ, Foretz M, Viollet B, *et al.* AMP-activated protein kinase phosphorylates and
   inactivates liver glycogen synthase. 2012;443:193–203.
- Burke KA, Jauniaux E, Burton GJ, Cindrova-Davies T. Expression and immunolocalisation of the
   endocytic receptors megalin and cubilin in the human yolk sac and placenta across gestation.
   *Placenta* [Internet] 2013;34:1105–1109. Elsevier.
- Burton GJ, Jauniaux E, Charnock-Jones DS. Human early placental development: potential roles of
   the endometrial glands. *Placenta* [Internet] 2007;28 Suppl A:S64-9. Elsevier.
- Burton GJ, Scioscia M, Rademacher TW. Endometrial secretions: creating a stimulatory
   microenvironment within the human early placenta and implications for the aetiopathogenesis of
   preeclampsia. *J Reprod Immunol* 2011;**89**:118–125.
- Burton GJ, Watson AL, Hempstock J, Skepper JN, Jauniaux E. Uterine Glands Provide Histiotrophic
   Nutrition for the Human Fetus during the First Trimester of Pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet] 2002;87:2954–2959.
- Caminos JE, Nogueiras R, Gallego R, Bravo S, Tovar S, García-Caballero T, Casanueva FF, Diéguez
   C. Expression and regulation of adiponectin and receptor in human and rat placenta. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet] 2005;90:4276–4286.
- Campos DB, Palin M-F, Bordignon V, Murphy BD. The "beneficial" adipokines in reproduction and
   fertility. *Int J Obes (Lond)* [Internet] 2008;**32**:223–231.
- Ceddia RB, Somwar R, Maida A, Fang X, Bikopoulos G, Sweeney G. Globular adiponectin increases
   GLUT4 translocation and glucose uptake but reduces glycogen synthesis in rat skeletal muscle
   cells. *Diabetologia* [Internet] 2005;48:132–139.

- Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L. Endogenous glucose production is inhibited by
   the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest* [Internet] 2001;108:1875–1881.
- Combs TP, Marliss EB. Adiponectin signaling in the liver. *Rev Endocr Metab Disord* [Internet]
   2014;15:137–147. NIH Public Access.
- 696 Corbetta S, Bulfamante G, Cortelazzi D, Barresi V, Cetin I, Mantovani G, Bondioni S, Beck-Peccoz P,
   697 Spada A. Adiponectin expression in human fetal tissues during mid- and late gestation. *J Clin* 698 *Endocrinol Metab* [Internet] 2005;90:2397–2402.
- Dean M, Hunt J, McDougall L, Rose J. Uterine glycogen metabolism in mink during estrus,
  embryonic diapause and pregnancy. *J Reprod Dev* [Internet] 2014;60:438–446. Japanese Society
  of Animal Reproduction.
- Dieudonne M-N, Bussiere M, Santos E Dos, Leneveu M-C, Giudicelli Y, Pecquery R. Adiponectin
   mediates antiproliferative and apoptotic responses in human MCF7 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet] 2006;345:271–279.
- Dockery P, Li TC, Rogers AW, Cooke ID, Lenton EA. The ultrastructure of the glandular epithelium
   in the timed endometrial biopsy. *Hum Reprod* [Internet] 1988;3:826–834.
- Duval F, Santos E Dos, Moindjie H, Serazin V, Swierkowski-Blanchard N, Vialard F, Dieudonné M N. Adiponectin limits differentiation and trophoblast invasion in human endometrial cells. *J Mol Endocrinol* [Internet] 2017;JME-17-0046Available from:
- 710 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28733350%0Ahttp://jme.endocrinology-
- 711 journals.org/lookup/doi/10.1530/JME-17-0046.
- Duval F, Santos E Dos, Poidatz D, Sérazin V, Gronier H, Vialard F, Dieudonné M-N. Adiponectin
  Inhibits Nutrient Transporters and Promotes Apoptosis in Human Villous Cytotrophoblasts:
  Involvement in the Control of Fetal Growth. *Biol Reprod* [Internet] 2016;Available from:
  http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27030046.
- Filant J, Spencer TE. Uterine glands: biological roles in conceptus implantation, uterine receptivity
   and decidualization. *Int J Dev Biol* [Internet] 2014;58:107–116.
- Freemark M. Epidermal Growth Factor Stimulates Glycogen Synthesis in Fetal Rat Hepatocytes:
   Comparison with the Glycogenic Effects of Insulin-Like Growth Factor I and Insulin\*.
   *Endocrinology* [Internet] 1986;119:522–526. Oxford University Press.
- Fu Y, Luo N, Klein RL, Garvey WT. Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin
   sensitivity, and lipid accumulation. *J Lipid Res* [Internet] 2005;46:1369–1379.
- Handschuh K, Guibourdenche J, Tsatsaris V, Guesnon M, Laurendeau I, Evain-Brion D, Fournier T.
   Human Chorionic Gonadotropin Produced by the Invasive Trophoblast But Not the Villous
   Trophoblast Promotes Cell Invasion and Is Down-Regulated by Peroxisome Proliferator Activated Receptor-γ. *Endocrinology* [Internet] 2007;148:5011–5019.
- Hempstock J, Cindrova-Davies T, Jauniaux E, Burton GJ. Endometrial glands as a source of nutrients,
   growth factors and cytokines during the first trimester of human pregnancy: a morphological and
   immunohistochemical study. *Reprod Biol Endocrinol* [Internet] 2004;2:58. BioMed Central.
- Irwin JC, Kirk D, King RJ, Quigley MM, Gwatkin RB. Hormonal regulation of human endometrial
   stromal cells in culture: an in vitro model for decidualization. *Fertil Steril* [Internet]
   1989;52:761–768.
- Jones CJPJP, Choudhury RHH, Aplin JDD. Tracking nutrient transfer at the human maternofetal
   interface from 4 weeks to term. *Placenta* [Internet] 2015;**36**:372–380.
- Jones HN, Jansson T, Powell TL. Full-length adiponectin attenuates insulin signaling and inhibits
   insulin-stimulated amino Acid transport in human primary trophoblast cells. *Diabetes* [Internet]

- **2010;59**:1161–1170.
- Kajantie E, Hytinantti T, Hovi P, Andersson S. Cord plasma adiponectin: a 20-fold rise between 24
  weeks gestation and term. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet] 2004;89:4031–4036.
- Karbowska J, Kochan Z. Role of adiponectin in the regulation of carbohydrate and lipid metabolism. J
   *Physiol Pharmacol* [Internet] 2006;**57 Suppl 6**:103–113.
- Kaur J, Debnath J. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet] 2015;16:461–472. Nature Research.
- Khorami SAH, Movahedi A, Huzwah K, Sokhini MMA. PI3K/AKT pathway in modulating glucose
   homeostasis and its alteration in Diabetes. *Ann Med Biomed Sci* [Internet] 2015;1:46–55.
- Kobayashi H, Ouchi N, Kihara S, Walsh K, Kumada M, Abe Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Selective
   suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin. *Circ Res* [Internet] 2004;94:e27-31.
- Krenzer S, Fluhr H, Deperschmidt M, Zwirner M, Wallwiener D, Licht P. Regulation of TIMP-1, -2
   and -3 in human endometrial stromal cells during decidualization and under the influence of
   hCG. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* [Internet] 2006;114:P07–086.
- Krzeslak A, Wojcik-Krowiranda K, Forma E, Jozwiak P, Romanowicz H, Bienkiewicz A, Brys M.
   Expression of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in endometrial and breast cancers.
   *Pathol Oncol Res* [Internet] 2012;18:721–728.
- Lambot N, Lybaert P, Boom A, Delogne-Desnoeck J, Vanbellinghen AM, Graff G, Lebrun P, Meuris
   S. Evidence for a clathrin-mediated recycling of albumin in human term placenta. *Biol Reprod* [Internet] 2006;75:90–97.
- Lappas M, Permezel M, Rice GE. Leptin and Adiponectin Stimulate the Release of Proinflammatory
   Cytokines and Prostaglandins from Human Placenta and Maternal Adipose Tissue via Nuclear
   Factor-κB, Peroxisomal Proliferator-Activated Receptor-γ and Extracellularly Regulated Kinase
   1/2. *Endocrinology* [Internet] 2005;146:3334–3342.
- Lunghi L, Ferretti ME, Medici S, Biondi C, Vesce F. Control of human trophoblast function. *Reprod Biol Endocrinol* [Internet] 2007;5:6.
- Machinal-Quélin F, Dieudonné MN, Leneveu MC, Pecquery R, Giudicelli Y. Proadipogenic effect of
   leptin on rat preadipocytes in vitro: activation of MAPK and STAT3 signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet] 2002;**282**:C853-63.
- Maeyama M, Sudo I, Saito K, Matsuo I, Nakahara K. Glycogen estimation by a rapid enzymic method
   in very small samples of human endometrium: glycogen content in the endometrium of infertile
   patients during the menstrual cycle. *Fertil Steril* [Internet] 1977;28:159–162.
- Maguire GA, Docherty K, Hales CN. Sugar transport in rat liver lysosomes. Direct demonstration by
   using labelled sugars. *Biochem J* [Internet] 1983;212:211–218. Portland Press Ltd.
- Mancini GM, Beerens CE, Verheijen FW. Glucose transport in lysosomal membrane vesicles. Kinetic
   demonstration of a carrier for neutral hexoses. *J Biol Chem* [Internet] 1990;265:12380–12387.
- Mimori H, Fukuma K, Matsuo I, Nakahara K, Maeyama M. Effect of progestogen on glycogen
  metabolism in the endometrium of infertile patients during the menstrual cycle. *Fertil Steril*[Internet] 1981;**35**:289–295.
- Mony VK, Benjamin S, O'Rourke EJ. A lysosome-centered view of nutrient homeostasis. *Autophagy* [Internet] 2016;12:619–631. Taylor & Francis.
- Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, Hotta K, Nishida M, Takahashi M,
   Muraguchi M, *et al.* Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-

- kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation* [Internet] 2000;102:1296–
  1301.
- Ploeg AT van der, Reuser AJJ. Pompe's disease. *Lancet (London, England)* [Internet] 2008;**372**:1342–1353.
- Poidatz D, Santos E Dos, Gronier H, Vialard F, Maury B, Mazancourt P De, Dieudonne M-N.
   Trophoblast syncytialisation necessitates mitochondrial function through estrogen-related
   receptor- activation. *Mol Hum Reprod* [Internet] 2015;21:206–216.
- Qiao L, Kinney B, Yoo HS, Lee B, Schaack J, Shao J. Adiponectin increases skeletal muscle
   mitochondrial biogenesis by suppressing mitogen-activated protein kinase phosphatase-1.
   *Diabetes* [Internet] 2012;61:1463–1470.
- Rosario FJ, Schumacher MA, Jiang J, Kanai Y, Powell TL, Jansson T. Chronic maternal infusion of
   full-length adiponectin in pregnant mice down-regulates placental amino acid transporter activity
   and expression and decreases fetal growth. *J Physiol* [Internet] 2012;590:1495–1509.
- Rose J, Hunt J, Shelton J, Wyler S, Mecham D. The effects of estradiol and catecholestrogens on
  uterine glycogen metabolism in mink (Neovison vison). *Theriogenology* [Internet] 2011;75:857–
  866.
- Salameh W, Helliwell JP, Han G, Mcphaul L, Khorram O. Expression of endometrial glycogen
   synthase kinase-3b protein throughout the menstrual cycle and its regulation by progesterone.
   *Mol Hum Reprod Adv Access Publ* 2006;12:543–549.
- Santos E Dos, Serazin V, Morvan C, Torre A, Wainer R, Mazancourt P de, Dieudonné M-N.
   Adiponectin and leptin systems in human endometrium during window of implantation. *Fertil Steril* [Internet] 2012a;97:771–778.e1.
- Santos E Dos, Serazin V, Morvan C, Torre A, Wainer R, Mazancourt P De, Dieudonné M-NN.
   Adiponectin and leptin systems in human endometrium during window of implantation. *Fertil Steril* [Internet] 2012b;97:.
- Simionescu N, Simionescu M, Palade GE. Permeability of intestinal capillaries. Pathway followed by
   dextrans and glycogens. *J Cell Biol* [Internet] 1972;53:365–392.
- Strowitzki T, Capp E, Wolff M von, Müller-Höcker J. Expression of glucose transporter 1 in human
   endometrial and decidual tissue. *Gynecol Endocrinol* [Internet] 2001;15:219–224.
- Takemura Y, Osuga Y, Yamauchi T, Kobayashi M, Harada M, Hirata T, Morimoto C, Hirota Y,
   Yoshino O, Koga K, *et al.* Expression of adiponectin receptors and its possible implication in the
   human endometrium. *Endocrinology* 2006;**147**:3203–3210.
- Takikita S, Myerowitz R, Schreiner C, Baum R, Raben N, Plotz PH. The values and limits of an in
  vitro model of Pompe disease: the best laid schemes o' mice an' men... *Autophagy* [Internet]
  2009;5:729–731.
- Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity.
   *Nat Rev Immunol* [Internet] 2006;6:772–783. Nature Publishing Group.
- Turner CT, Fuller M, Hopwood JJ, Meikle PJ, Brooks DA. Glycogen Exocytosis from Cultured
   Pompe Skin Fibroblasts. *Transl Biomed* [Internet] 2015;6:. iMedPub.
- Yamauchi T, Hara K, Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Froguel P, Nagai R, Kadowaki T. Dual roles of
   adiponectin/Acrp30 in vivo as an anti-diabetic and anti-atherogenic adipokine. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* [Internet] 2003a;3:243–254.
- Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K,
   Tsunoda M, *et al.* Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects.
   *Nature* [Internet] 2003b;423:762–769.

- Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki
  K, *et al.* Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMPactivated protein kinase. *Nat Med* [Internet] 2002;8:1288–1295.
- 829 Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K,
- 830 Tsuboyama-Kasaoka N, *et al.* The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance
- associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* [Internet] 2001;7:941–946.













#### Glycogen Synthase (% of control) (Iortroo) of %) ANAm



# Glycogen accumulation (μg/μl) (% of control)



Glycogen Phosphorylase mRNA / reference Benes mRNA (% of control)





phospho-MPKα/total- AMPKα protein (% of control) Figure 4



### Glycogen accumulation in ESCs (μg/μl) (% of control)





\*

350 J

Adiponectin 250 ng/ml

Adiponectin 25 ng/ml

Adiponectin 0 ng/ml

0



6

Dextran structure

C







































**FITC-dextran** 

EEA-1

Merge









25 µm

6 h





















30 min









**FITC-dextran** 

LAMP-1

Merge

FITC-dextran / EEA-1 association (Pearson's coefficient)



FITC-dextran / LAMP-1 association (Pearson's coefficient)



Figure 11



# Table 1 - Primers used for RT-PCR

Primer set	Sequence	PCR product (bp)
GLUT1 Sense Antisense	5' TGA GCA TCG TGG GCA TCT TT 3' 3' AAG CTA CTC TAG CGA AGG CC 5'	298
GLUT3 Sense Antisense	5' CAG GCA CAC GGT GCA GAT AG 3' 3' CCA CGC AGA TGG GAA CCT TA 5'	67
GS Sense Antisense	5' AGG CCT TTC CAG AGC ACT TC 3' 3' TGG TCT CAC TCC TGC TCC TC 5'	140
GP Sense Antisense	5' GCA CGC AGC AGC ACT ACT AT 3' 3' ATA CCC TGC CTG CGA TGT CT 5'	84
TBP Sense Antisense	5' TGC ACA GGA GCC AAG AGT GAA 3' 3' CAC ATC ACA GCT CCC CAC CA 5'	132
B2-MICROGLOBULIN Sense Antisense	5' TGC TGT CTC CAT GTT TGA TGT ATC T 3' 3' TCT CTG CTC CCC ACC TCT AAG T 5'	86
RPL13A Sense Antisense	5' CCT GGA GGA GAA GAG GAA AGA GA 3' 3' TTG AGG ACC TCT GTG TAT TTG TCA A 5'	125

# Table 2 - Primary antibodies used for immunoblotting

Targets	Species	Blocking	Dilution	Incubation	Supplier
phospho-AMPKa	Rabbit	Gelatin 2.5% (2 h)	1 : 700	Room temperature	Cell Signaling
ΑΜΡΚα	Rabbit	Gelatin 2.5% (2 h)	1:1000	Room temperature	Cell Signaling
phospho-GSK3β	Rabbit	BSA 5% (1 h)	1:1000	+ 4°C	Cell Signaling
GSK3β	Mouse	BSA 5% (1 h)	1 : 500	+ 4°C	Cell Signaling
β-actin	Rabbit	Milk 5% (1 h)	1 : 500	+ 4°C	Sigma Aldrich

# **R**ÉGULATION DE LA CROISSANCE FŒTALE PAR L'ADIPONECTINE

# **E**TUDE DU TRANSPORT DE NUTRIMENTS, DU MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE ET DE L'APOPTOSE DANS LE PLACENTA HUMAIN

# ARTICLE 4

# Adiponectin inhibits nutrient transporters and promotes apoptosis in human villous cytotrophoblasts : involvement in the control of fetal growth

**Fabien Duval**, Esther Dos Santos, Dorothée Poidatz, Valérie Sérazin, Héloïse Gronier, François Vialard, Marie-Noëlle Dieudonné

# **BIOLOGY OF REPRODUCTION (2016)**

### Introduction

Le placenta est un organe d'origine fœtale, mis en place par l'embryon afin que celui-ci puisse se développer au sein de l'organisme maternel. Ainsi, le placenta oxygène, nourrit et épure le fœtus, assurant les rôles de poumon, d'intestin et de rein durant toute la période intra-utérine. A la fin de la troisième semaine de grossesse, les villosités choriales constituant l'unité structurale et fonctionnelle du placenta ont acquis leur structure définitive. Elles sont constituées de deux populations cellulaires assurant des fonctions distinctes : les lignées trophoblastiques extravilleuse et villeuse.

Les cytotrophoblastes extravilleux sont situés à la base des villosités crampons au contact direct des cellules endométriales. Au cours de la placentation, ces cellules acquièrent un phénotype invasif leur permettant d'assurer l'ancrage du placenta à l'endomètre maternel. Les cytotrophoblastes villeux (CTV) se différencient par un mécanisme de fusion cellulaire pour former le syncytiotrophoblaste (ST). Notre laboratoire a montré que la syncytialisation trophoblastique s'accompagne de modifications importantes des fonctions mitochondriales placentaires (article 5 présenté en annexe 1). Le ST situé en périphérie de la villosité choriale, au contact direct de la chambre intervilleuse, assure les échanges fœto-maternels. En particulier, le ST est impliqué dans l'apport de nutriments au fœtus et la régulation de la croissance fœtale. Pour assurer ces fonctions essentielles au bon déroulement de la grossesse, le ST présente une activité métabolique intense. Il est notamment estimé que le placenta utilise pour ses propres besoins 60% du glucose provenant de la circulation maternelle. Le glucose est ensuite catabolisé pour assurer les besoins en ATP des cellules placentaires. L'autre partie du glucose entrant dans le ST est transmis au fœtus par l'intermédiaire des capillaires fœtaux présents dans la villosité.

L'adiponectine est une adipokine connue pour son action insulino-sensibilisatrice dans le foie et le muscle. Elle stimule notamment le transport et le catabolisme du glucose et des lipides. Ces effets sont associés à une stimulation de la fonction mitochondriale et à une inhibition de la néoglucogenèse et de la lipogenèse hépatiques. Elle est également décrite pour son action anti-proliférative et pro-apoptotique, notamment dans les cellules cancéreuses.

De nombreuses données suggèrent que la survenue de pathologies de la croissance fœtale, telles que le retard de croissance intra-utérin (RCIU) ou à l'inverse, la macrosomie, est corrélée à une dérégulation

du transport des nutriments, de la fonction mitochondriale et de l'apoptose dans le placenta. Une étude récente a montré que le taux d'adiponectine maternelle est corrélé négativement au poids du fœtus à la naissance. Ces résultats suggèrent que l'adiponectine pourrait exercer un contrôle négatif sur la croissance fœtale.

L'objectif de cette étude est d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle de la croissance fœtale par l'adiponectine. Ainsi, nous nous sommes intéressés à l'étude du rôle de l'adiponectine dans le contrôle (i) du transport de nutriments (glucose et acides aminés), (ii) du métabolisme énergétique, (iii) de la fonction mitochondriale et (iv) l'apoptose dans le placenta humain de premier trimestre.

### Matériels et Méthodes

**Population d'étude**. Cette étude a été réalisée à partir de placentas humains de premier trimestre de grossesse, obtenus au CHIPS. Les placentas sont récupérés suite à une interruption volontaire de grossesse réalisée entre 5 et 10 semaines de grossesse. Les patientes incluses dans cette étude sont au nombre de 39 et ont un âge compris entre 18 ans et 44 ans (âge moyen  $26,6 \pm 1,2$  ans).

Isolement des cellules trophoblastiques villeuses (CTV) humaines. Les placentas sont tout d'abord lavés abondamment dans du sérum physiologique froid pour éliminer les éventuelles traces de sang. Puis, le tissu placentaire est émincé en fragments de 1 mm<sup>3</sup> environ, afin d'isoler les villosités placentaires. Les villosités sont à nouveau rincées abondamment dans du sérum physiologique froid et centrifugées deux fois durant 5 minutes à 200g afin d'éliminer les hématies. Le tissu placentaire est ensuite incubé dans un milieu de digestion pendant 15 minutes à 37°C, composé du tampon HBSS 1X contenant de la trypsine (0,125%), de la DNAse de type IV (50 U/ml), de l'hepes (25 mM) et MgSO<sub>4</sub> (4,2 mM). Cinq à six digestions sont ainsi réalisées. Les surnageants de chaque digestion sont filtrés sur une membrane de nylon (100  $\mu$ m), rassemblés et conservés à 37°C. Le reliquat de tissu digéré subit alors une dizaine de lavages avec du tampon HBSS 1X. Les surnageants de chaque lavage sont filtrés sur une membrane de nylon (100  $\mu$ m), rassemblés et conservés à 37°C. Les filtrats issus des digestions et des lavages sont alors centrifugés 10 minutes à 200g, les culots cellulaires sont réunis et repris dans

un milieu de culture composé de DMEM/F12, de sérum de veau fœtal (10%) et d'antibiotiques (pénicilline (10  $\mu$ g/ml) et streptomycine (100 U/ml)). Après filtration sur nylon (40  $\mu$ m), les cellules sont déposées sur un gradient de Percoll (20-55%) et centrifugées 25 minutes à 1000g. Les trophoblastes sont prélevés aux interfaces 40-45% et 45-55% puis lavés abondamment dans le milieu de culture décrit précédemment, avant d'être centrifugés 10 minutes à 200g. Les CTV sont alors ensemencés dans un milieu de culture composé de DMEM/F12 contenant du sérum de veau fœtal (10%) et des antibiotiques (pénicilline (10  $\mu$ g/ml) et streptomycine (100 U/ml)) et placées à 37°C sous 5% CO<sub>2</sub> en atmosphère humide.

**Culture des CTV**. Le lendemain de l'isolement, les CTV sont placées dans un milieu DMEM/F12 contenant du sérum de veau fœtal (1%) et des antibiotiques (pénicilline (10  $\mu$ g/ml) et streptomycine (100 U/ml)), supplémenté ou non en adiponectine (25 ng/ml, 250 ng/ml ou 500 ng/ml) pendant 24, 48 ou 72 heures.

**Culture d'explants placentaires**. Les tissus placentaires sont lavés abondamment dans du sérum physiologique afin d'éliminer les membranes fœtales et les tissus maternels (décidue). De petits fragments de 2 mm<sup>3</sup> environ sont découpés et placés sur du collagène pendant 2 heures à 37°C. Un milieu DMEM/F12 contenant du sérum de veau fœtal (1%) et des antibiotiques (pénicilline (10  $\mu$ g/ml) et streptomycine (100 U/ml)), supplémenté ou non en adiponectine (250 ng/ml) est ensuite ajouté. Les explants sont maintenus en survie pendant 48 heures.

Validation du protocole d'isolement des CTV. Afin de vérifier la pureté de la préparation cellulaire, des expériences d'immunocytochimie sur les cellules placentaires ont été réalisées. Le marquage de la cytokératine-7 a été utilisé comme marqueur spécifique des cellules épithéliales. De plus, nous avons observé la formation spontanée d'un syncytium après 72 heures de culture, ce qui démontre que les cellules isolées sont bien des CTV. Enfin, le dosage de l'hormone chorionique gonadotrope (hCG) dans les surnageants de culture cellulaire après 24 h, 48 et 72 h de culture, confirme également la présence de CTV se différenciant en ST capable d'assurer une fonction endocrine.

**Etude de l'expression des transporteurs de nutriments dans les CTV**. L'expression des transporteurs du glucose (GLUT) et des acides-aminés (SNAT) a été étudiée dans les CTV par RT-qPCR après 24 h et 48 h de culture, en présence ou non d'adiponectine. L'expression de GLUT1,12 et SNAT1,2,4 a été mesurée. Selon la littérature, il s'agit des isoformes les plus exprimés dans le placenta de premier trimestre. L'expression des protéines GLUT1 et SNAT1 a été quantifiée par immunohistochimie dans des coupes d'explants placentaires.

**Etude du catabolisme du glucose**. La production de lactate dans les surnageants de culture a été mesurée afin d'étudier le devenir du glucose dans les CTV. En parallèle, la production d'ATP par les CTV a été quantifiée à l'aide d'un dosage fluorométrique (kit Abcam ab83355).

Etude de la fonction mitochondriale. La fonction mitochondriale a été étudiée par deux approches. Tout d'abord, l'expression de quatre gènes clés de la biogénèse mitochondriale (PGC-1 $\alpha$ , ERR $\gamma$ , SIRT1, NRF1) a été mesurée par RT-qPCR dans les CTV maintenus en culture en présence ou non d'adiponectine. D'autre part, l'activité mitochondriale a été analysée dans les CTV soumis ou non à l'adiponectine, par l'utilisation d'une sonde fluorescente (rosamine) spécifique des mitochondries actives présentant un potentiel de membrane (le Mitotracker), observable en microscopie confocale.

**Etude de l'apoptose**. L'expression de deux gènes pro-apoptotiques (TP53 et BAX) et d'un gène antiapoptotique (BCL-2) a été étudiée dans les CTV par RT-qPCR après 24 h et 48 h de culture, en présence ou non d'adiponectine. En parallèle, l'activation des caspases a été quantifiée en réalisant un immunomarquage M30 (spécifique de la cytokératine-18 clivée suite à l'action des caspases) sur des explants placentaires maintenus en survie en présence ou en absence d'adiponectine.

**Invalidation de ADIPOR1 et ADIPOR2**. Afin de vérifier que les effets de l'adiponectine dans les CTV sont réalisés par l'intermédiaire de ses deux récepteurs spécifiques, l'expression de ADIPOR1 et ADIPOR2 a été inhibée par l'utilisation de petits ARN interférents (siRNA). Le lendemain de l'isolement, les CTV sont transfectés avec 10 nM d'un siRNA contrôle (siNS) et 25 nM d'un siRNA dirigé contre les ADIPOR (siADIPOR1/R2). Puis, l'adiponectine (250 ng/ml) est ajoutée pendant 24 h. L'invalidation de ADIPOR1 et ADIPOR2 est vérifiée par RT-qPCR. Les effets de cette invalidation sur

• 203 •

le transport de nutriment a été analysée en mesurant l'expression de GLUT1 par RT-qPCR. L'impact de l'invalidation des ADIPOR sur l'apoptose a été mesuré en quantifiant l'expression de TP53 par RT-qPCR.

### Résultats et Conclusions

Par des expériences d'immunocytochimie, nous avons observé que 95% des cellules isolées expriment la cytokératine-7, une protéine spécifique des épithéliums. Ces expérimentations permettent également de mettre en évidence que les cellules isolées ont fusionné et forment un syncytium, après 72 heures de culture. De plus, en dosant la sécrétion de l'hCG dans les surnageants de culture cellulaire, nous avons observé que la production de cette hormone augmente progressivement au cours de la culture cellulaire (1113  $\pm$  271, 4232  $\pm$  910, 10015  $\pm$  867 mUI/µg de protéines après 24, 48 et 72 h de culture, respectivement). L'ensemble de ces résultats confirme que **les cellules isolées sont effectivement des CTV**.

Nous avons étudié les effets de l'adiponectine sur l'expression des transporteurs de nutriments dans les CTV. Après 24 h de culture cellulaire, nous avons observé que l'adiponectine diminue l'expression de GLUT1 pour toutes les doses testées, avec un effet maximal à 250 ng/ml (-50%). De manière similaire, l'adiponectine réduit l'expression de GLUT12 à 25 ng/ml (-36%) et 250 ng/ml (-36%). Cet effet inhibiteur de l'adiponectine sur l'expression des GLUT est maintenu après 48 h culture. En effet, l'adiponectine diminue l'expression de GLUT1 à 250 ng/ml (-40%) et 500 ng/ml (-50%) et l'expression de GLUT12 à 25 ng/ml (-18%), 250 ng/ml (-33%) et 500 ng/ml (-56%). Ces résultats ont été confirmés par immunohistochimie. Nous avons observé une réduction du marquage GLUT1 (-20%) en présence d'adiponectine (250 ng/ml) après 48 heures de culture.

Concernant le transport des acides aminés, nos résultats de RT-qPCR démontrent qu'après 24 h de traitement, l'adiponectine diminue l'expression de SNAT1 (-36% et -49% à 25 ng/ml et 250 ng/ml, respectivement). L'adiponectine diminue également l'expression de SNAT2 (-33% et -46% à 25 ng/ml et 250 ng/ml, respectivement). L'adiponectine inhibe également l'expression de SNAT4 spécifiquement à la dose de 250 ng/ml (-50%). Cependant, dans nos conditions expérimentales, ces effets de

l'adiponectine sur l'expression de SNAT1,2,4 ne perdure pas après 48 h de traitement. En revanche, nos expériences d'immunohistochimie démontrent que l'expression de la protéine SNAT1 est diminuée (-30%) dans les cellules placentaires cultivées en présence d'adiponectine (250 ng/ml). L'ensemble de ces résultats suggère que dans les CTV, **l'adiponectine réduit le transport du glucose et dans une moindre mesure celui des acides aminés**.

Afin d'identifier la voie métabolique du glucose intracellulaire dans les CTV, nous avons réalisé le dosage de lactate et d'ATP total. Ainsi, nous avons observé qu'après 24 h de traitement, l'adiponectine réduit significativement la production de lactate par les CTV (-16% et -22% à 25 ng/ml et 250 ng/ml, respectivement). Cet effet est également décrit après 48 heures de culture, où nous observons une diminution de la production de lactate (-16%) par les CTV en présence d'adiponectine (250 ng/ml). En parallèle, après 48 heures de culture, nous avons démontré que l'adiponectine induit une augmentation de la production d'ATP total par les CTV (+30% et +24% à 25 ng/ml et 250 ng/ml, respectivement). Ainsi, l'adiponectine favorise la glycolyse aérobie dans les CTV.

La mitochondrie est l'organite clé du métabolisme énergétique et de la production d'ATP. Nous avons donc souhaité étudier plus précisément le rôle de l'adiponectine sur la fonction mitochondriale dans les CTV. Nous avons tout d'abord observé que l'adiponectine réduit significativement le nombre de mitochondries actives dans les CTV (-44% et -62% à 25 ng/ml et 250 ng/ml, respectivement). Cet effet semble s'expliquer par un effet inhibiteur de l'adiponectine sur la biogénèse mitochondriale. En effet, nous avons mesuré par RT-qPCR que l'adiponectine à la dose de 250 ng/ml spécifiquement, réduit significativement l'expression de gènes clés de la biogénèse mitochondriale, tels que PGC-1 $\alpha$  (-39%), ERR $\gamma$  (-47%), SIRT1 (-48%) et NRF1 (-47%). L'adiponectine inhibe la fonction mitochondriale dans les CTV.

De manière surprenante, l'adiponectine semble donc exercer des effets contradictoires sur le métabolisme énergétique des CTV. En effet, alors qu'elle inhibe la biogénèse mitochondriale, réduisant ainsi le nombre de mitochondries actives et fonctionnelles, elle augmente la production d'ATP. Cette perte du stock mitochondrial associée à une augmentation de la production d'énergie est observée au cours du processus apoptotique. Nous nous sommes donc intéressés aux effets de l'adiponectine sur

l'apoptose des CTV. Nous avons observé que l'adiponectine augmente fortement l'expression de deux gènes pro-apoptotiques, BAX (+283%, +228% et +513% à 25 ng/ml et 250 ng/ml, respectivement) et TP53 (+98%, +209% et +524% à 25 ng/ml et 250 ng/ml, respectivement) dans les CTV après 24 h de traitement. Ces effets sont maintenus après 48 h de traitement. En revanche, l'adiponectine ne modifie pas l'expression du gène anti-apoptotique BCL-2. Cependant le ratio BAX/BCL-2 est significativement augmenté après 24 h et 48 h de traitement en présence d'adiponectine. De plus, l'activation des caspases dans des explants placentaires est fortement augmentée (+141%) en présence d'adiponectine (250 ng/ml). Cette augmentation est comparable à celle induite par la staurosporine, un agent apoptotique (+172%). L'ensemble de ces résultats suggèrent que **l'adiponectine exerce une action pro-apoptotique dans les CTV**.

Dans une dernière partie, nous avons souhaité invalider par ARN interférents les deux récepteurs spécifiques de l'adiponectine, ADIPOR1 et ADIPOR2 dans les CTV. Nos résultats de RT-qPCR valident notre protocole d'invalidation, puisque nous observons une réduction de l'expression de ADIPOR1 et ADIPOR2 après transfection des CTV par les siADIPOR1/R2 (-75% et -44% pour ADIPOR1 et ADIPOR2, respectivement). Nous avons également observé que la suppression de l'expression des ADIPOR entraîne la disparition (i) de l'effet inhibiteur de l'adiponectine sur l'expression du transporteur GLUT1 et (ii) de l'effet pro-apoptotique *via* TP53, suggérant que **les récepteurs ADIPOR1 et ADIPOR2 sont impliqués dans ces effets**.

### Discussion

Dans cette étude, nous avons démontré que l'adiponectine exerce des effets métaboliques atypiques dans les CTV. En effet, l'adiponectine inhibe l'expression des transporteurs de nutriments et la biogénèse mitochondriale. Ces effets sont totalement opposés à ceux décrits dans les cellules musculaires, tissu cible préférentiel de l'adiponectine. En revanche, il apparait qu'elle exerce dans les CTV son rôle d'hormone pro-apoptotique décrit dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires.

La croissance fœtale est un processus hautement contrôlé par le placenta tout au long de la grossesse. Ce contrôle fait intervenir de nombreux facteurs d'origine maternelle (cytokines, insuline, hormones

• 206 •

stéroïdes...) et placentaire (cytokines, hormone lactogène placentaire, hormone chorionique gonadotrope...). Ces molécules agissent sur la croissance fœtale, en contrôlant en particulier (i) l'expression des transporteurs de nutriments dans le ST et (ii) l'apoptose placentaire. De plus, il a été décrit dans les cas de RCIU que les placentas présentent un défaut d'expression des transporteurs de nutriments et/ou un excès d'apoptose placentaire. A l'inverse, dans le cas des fœtus macrosomes, le transport de nutriments semble augmenté et l'apoptose placentaire diminuée.

L'adiponectine maternelle pourrait réguler négativement la croissance fœtale en inhibant le transport de nutriments et en induisant un effet pro-apoptotique dans le placenta de premier trimestre. Ainsi, l'adiponectine contribuerait à réduire le risque de survenue de macrosomie fœtales et de toutes les complications associées.

# Adiponectin Inhibits Nutrient Transporters and Promotes Apoptosis in Human Villous Cytotrophoblasts: Involvement in the Control of Fetal Growth<sup>1</sup>

# Fabien Duval,<sup>3</sup> Esther Dos Santos,<sup>3,4</sup> Dorothée Poidatz,<sup>3</sup> Valérie Sérazin,<sup>3,4</sup> Héloïse Gronier,<sup>3</sup> François Vialard,<sup>3,5</sup> and Marie-Noëlle Dieudonné<sup>2,3</sup>

<sup>3</sup>GIG-EA 7404, Université de Versailles-Saint Quentin en Yvelines, Unité de Formation et de Recherche des Sciences de la Santé Simone Veil, Montigny-le-Bretonneux, France

<sup>4</sup>Service de Biologie Médicale, Centre Hospitalier de Poissy-Saint-Germain, Poissy, France

<sup>5</sup>Département de Biologie de la Reproduction, Cytogénétique, Gynécologie et Obstétrique, CHI de Poissy-Saint-Germain, Poissy, France

#### ABSTRACT

The placenta exchanges nutrients between the mother and the fetus and requires a constant abundant energy supply. Adiponectin (a cytokine produced primarily by adipose tissue) controls glucose and lipid homeostasis. It is well-known that maternal serum adiponectin levels are inversely related to birth weight, suggesting that adiponectin has a negative effect on fetal growth. This effect appears to be related to the control of nutrient transporters in human placenta. However, the underlying molecular mechanisms have not yet been characterized. In the present work, we studied adiponectin's direct effect on human primary cytotrophoblasts from first-trimester placenta. Our result showed that in placental cells, adiponectin 1) inhibits the expression of the major glucose transporters (GLUT1 and GLUT12) and sodium-coupled neutral amino acid transporters (SNAT1, SNAT2, and SNAT4), 2) enhances total ATP production but decreases lactate production, 3) inhibits mitochondrial biogenesis and function, and 4) stimulates cell death by enhancing the expression of the pro-apoptotic B-cell lymphoma-2 (BCL-2)-associated X protein (BAX) and tumor protein P53 (TP53) gene expression and inducing the caspase activity. Smallinterfering RNA mediating the down-regulation of adiponectin receptors (ADIPOR1 and ADIPOR2) was used to demonstrate that adiponectin effects on placental nutrient transport and apoptosis seemed to be essentially mediated by these specific receptors. Taken as a whole, these results strongly suggest that adiponectin regulates human placental function by limiting nutrient transporter expression and inducing apoptosis. These findings may help us to better understand adiponectin's role in placental pathologies such as intrauterine growth restriction, which is characterized by fetal weight loss and drastic apoptosis of placental cells.

adiponectin, apoptosis, fetal growth, nutrient transporter, villous trophoblast

### INTRODUCTION

Adiponectin is a 30 kDa protein, predominantly produced by adipose tissue. In humans, it is present in high concentrations in the blood  $(5-15 \mu g/ml)$  [1]. This adipokine assembles as trimers (low molecular weight complexes) that may assemble further to yield hexamers (middle molecular weight forms) or more elaborate high molecular weight complexes composed of nine hexamers. In humans, the high molecular weight form is predominant in the circulation and corresponds to the active biological form of adiponectin [2]. In 2003, two specific adiponectin receptors (ADIPOR1 and ADIPOR2) were identified [3]. ADIPOR1 is ubiquitously expressed but ADIPOR2 is predominantly expressed in liver. Both receptors contain seven transmembrane domains but are structurally and functionally distinct from G-protein coupled receptors. More recently, an additional receptor for adiponectin (T-cadherin) has been described [4]. ADIPOR1 and ADIPOR2 activate a variety of signal transduction pathways such as the AMPactivated protein kinase (AMPK), protein kinase A, phosphoinositide-3 kinase, and P38/P42/P44 mitogen-activated protein kinase pathways [1, 3, 5, 6]. Adiponectin is mainly described as an insulin-sensitizing hormone with an important role in the regulation of energy metabolism [7, 8]. In skeletal muscle, for example, adiponectin stimulates glucose transport (by increasing glucose transporter [GLUT] 4 translocation [9] and activating insulin signaling) and up-regulates molecules involved in fatty acid transport, fatty acid oxidation, and energy dissipation; this results in a reduction in triglyceride content [10]. In the liver, adiponectin increases beta-oxidation [11] and decreases gluconeogenesis [12]. These metabolic effects are mainly mediated via the AMPK pathway, which acts as a key sensor of the cell's energy status. Moreover, adiponectin is known to stimulate mitochondrial biogenesis in muscle by increasing the expression of the genes encoding the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha (PPARGC1A) [10, 13], sirtuin 1 (SIRT1) [13, 14], and nuclear respiratory factor 1 (NRF1) [14]. Furthermore, adiponectin has been shown to exert anti-inflammatory, antiangiogenic, anti-atherosclerotic, and antiproliferative roles in various cell types [15]. Lastly, various in vitro studies have reported that adiponectin promotes the apoptosis of many cell types, including human mammary and endometrial cancer cells [16-18]. Adiponectin's pro-apoptotic effects might be due, at least in part, to the direct regulation of the pro-apoptotic B-cell lymphoma-2 (BCL-2) family protein, BCL-2-associated X protein (BAX), the tumor protein P53 (TP53) gene expression, and caspase-3 activation [16, 19].

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>This work was funded by the Fonds de dotation en faveur de la Recherche en Santé de la Femme, en Santé Reproductrice et Périnatale. <sup>2</sup>Correspondence: Marie-Noëlle Dieudonné, EA 7404, Gamètes -Implantation - Gestation, 2 avenue de la Source le Bièvre, UFR des Sciences de la Santé Simone Veil, F-78180 Montigny-le-Bretonneux, France. E-mail: marie-noelle.dieudonne@uvsq.fr

Received: 14 August 2015.

First decision: 12 September 2015.

Accepted: 22 March 2016.

<sup>© 2016</sup> by the Society for the Study of Reproduction, Inc. This article is available under a Creative Commons License 4.0 (Attribution-Non-Commercial), as described at http://creativecommons.org/licenses/by-nc/ 4.0

eISSN: 1529-7268 http://www.biolreprod.org ISSN: 0006-3363
In human pregnancy, trophoblast cells have an essential role in embryo implantation and placental development. It is now well established that trophoblast cells can differentiate according to one of two distinct pathways. In the extravillous pathway, cytotrophoblasts (CTs) proliferate, differentiate into an invasive phenotype, and penetrate into the maternal decidua and myometrium [20]. In the villous pathway, mononuclear CTs fuse to form a specialized, multinuclear syncytium called the syncytiotrophoblast (ST) on the outer layer of placental villi [20]. The ST layer performs many placental functions necessary for fetal growth and development, including nutrient and gas exchanges as well as the synthesis of steroid and peptide hormones [20]. Thus, the ST displays intense metabolic activity, and it has been estimated that it accounts for 60% of the placenta's glucose consumption. Mitochondria perform a variety of functions related to several distinct biochemical processes, such as oxidative phosphorylation, amino acid and lipid metabolism, apoptosis, and cell differentiation. The mitochondria's roles in energy production are essential for embryo development and placental function. We recently demonstrated that the mitochondrial content and expression of various nuclear factors (estrogen-related receptor gamma [ESRRG], PPARGC1A, and SIRT1) involved in mitochondrial biogenesis and function are significantly lower in intrauterine growth restriction (IUGR) placentas than in control placentas [21]. These results suggested that mitochondrial integrity is essential for correct development of the placenta and fetal growth.

A growing body of evidence suggests that adiponectin is involved in human reproductive function and, more particularly, in the development of the fetal-placental unit [22, 23]. For example, adiponectin knockout mice are fertile [24], but transgenic mice overexpressing adiponectin are sterile [25]. Although earlier reports suggested that adiponectin was produced by human placenta, it is now well established that this adipokine is only secreted by maternal endometrial cells [26, 27]. However, ADIPOR1 and ADIPOR2 are both expressed in human endometrium and placenta, suggesting that this adipokine has an auto/ paracrine action at the fetal-maternal interface [27, 28]. We have previously shown that adiponectin attenuates cell proliferation in human first-trimester placenta and, inversely, is able to promote both invasion and syncytialization of the human trophoblast [29, 30]. Lastly, several studies have reported that adiponectin is involved in the control of fetal growth [31]. Indeed, maternal levels of circulating adiponectin are inversely related to human fetal weight [31, 32]. Experiments performed on pregnant mice demonstrated that adiponectin injection is associated with fetal weight loss [33]. One explanation for the latter observation is that adiponectin attenuates insulin signaling and inhibits solute carries (SLC) family protein, such as the L-type amino acid transporters (LAT), sodium-coupled neutral amino acid transporters (SNAT), and GLUT3 expressions in murine placenta [28, 33]. This hypothesis was confirmed by in vitro experiments in human CTs from third-trimester placenta [34, 35]. Taken as a whole, these results suggest that adiponectin regulates fetal growth. However, the underlying molecular mechanisms have not been identified.

In view of adiponectin's known involvement in energy metabolism and fetal growth control, the objective of the present study was to specify, the adiponectin's direct effects on 1) nutrient transport and utilization, 2) mitochondrial biogenesis, and 3) cell apoptosis in human villous trophoblasts from first-trimester placenta.

#### MATERIALS AND METHODS

#### Materials

Dulbecco-modified Eagle medium and Ham F-12 nutrient mix (DMEM/ F12), penicillin, and streptomycin were purchased from Sigma Chemical Co. Fetal calf serum (FCS) was purchased from Gibco (Invitrogen). Superscript II RNase H-RT and primers were from Invitrogen, and RNAse inhibitor was obtained from AMRESCO. Nucleospin RNA II kit was obtained from Machery-Nagel. Trypsin was provided by Difco Laboratories. Recombinant human adiponectin was provided by R&D Systems Europe Ltd. The suppliers of the various antibodies used are described in the following paragraphs.

#### Preparation of Human Villous CTs

The study was approved by the local ethical committee (Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Médicale, protocol 01-78), and informed consent was provided by each donor prior to sampling. First-trimester human placental tissues (gestational age: 5–10 wk) were obtained from healthy, pregnant women aged between 22 and 44 at the time of a legal abortion. Villous CTs were prepared from the tips of placental villi as previously described [36]. The CTs were seeded in 12-well culture plates or in a LabTech culture device (1.5 × 10<sup>6</sup> and 6.0 × 10<sup>4</sup> cells per well, respectively) and cultured in phenol-red-free DMEM/F12 medium supplemented with streptomycin (10 µg/ml), penicillin (100 U/ml), and FCS (10%) at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> and 95% air atmosphere for 24 h. Next, CTs were cultured in DMEM/F12 medium supplemented with FCS (1%) in the presence or absence of recombinant human adiponectin (25, 250, or 500 ng/ml) for 24 or 48 h.

#### Immunocytochemistry

Villous CTs were plated in a LabTech culture device (BD Biosciences) and cultured in DMEM/F12 medium supplemented with FCS (10%). After 72 h of treatment, cells were washed three times in phosphate-buffered saline (PBS) and fixed in methanol for 10 min at 4°C. Nonspecific immunoglobulin G binding was prevented by incubation in PBS with 3% bovine serum albumin for 1 h at room temperature. Mouse monoclonal anti-human cytokeratin-7 primary antibody (1:100 dilution, M-7018; Dako Cytomaton) was incubated with the villous CTs for 1 h at room temperature. The slides were then rinsed with PBS and incubated with an Alexa-488-conjugated, goat-anti-mouse secondary antibody (1:400 dilution, Amax/Emax: 488/519, A-11001; Thermo Fisher Scientific Inc.) for 1 h at room temperature. Cell nuclei were counterstained with 1  $\mu$ g/ml Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich). As a negative control, villous CTs were processed in the absence of primary antibody. Immunostained samples were observed with an inverted laser scanning confocal microscope (Leica white light laser TCS SP8-X; Leica Microsystems).

#### Placental Explants Culture

Samples of placental tissue (gestational age: 6–10 wk) were obtained from healthy pregnant women aged between 18 and 35 at the time of a legal abortion. Placental tissues were placed in saline (150 mM NaCl), washed several times, and dissected aseptically to remove decidual tissues and fetal membranes. Placental explants were cultured on collagen type-I-coated dishes (BD Biosciences) in DMEM/F12 medium with FCS (1%) at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> and 95% air atmosphere for 48 h in the presence or absence of adiponectin (250 ng/ml) or the positive control staurosporin (0.1  $\mu$ M).

#### Immunohistochemistry

Placental explants were fixed in cold phosphate-buffered neutral paraformaldehyde (4%), embedded in paraffin, and cut into 5 µm sections. For heatinduced epitope retrieval, deparaffinized sections in 0.01 M citrate buffer were treated three times for 5 min at 90°C in a microwave oven. Endogenous peroxidase activity was blocked with 1% H2O2, and nonspecific immunoglobulin G binding was blocked by incubation with normal blocker serum. To study nutrient transporters expression, samples were incubated with primary GLUT1 (1:100 dilution; Millipore) and SNAT1 (1:100 dilution, sc-33441; Santa Cruz Biotechnologies, Inc.) antibodies for 1 h at room temperature. Caspase-cleaved cytokeratin-18 fragment, specific for cell apoptosis, was studied using M30 antibody (1:10 dilution, M30 CytoDEATH; Roche) for 1 h at room temperature. The slides were then rinsed and incubated with biotin-conjugated secondary antibody for 10 min at room temperature. Visualization was achieved using a 3,3' -diaminobenzidine (DAB) detection kit (Ventana Medical Systems). As a negative control, placental explants were processed in the absence of primary antibody. Before mounting, the slides were counterstained

## ADIPONECTIN AND TROPHOBLAST ENERGY METABOLISM

TABLE 1.	Primers	used	for	RT-P	CR.
IADLE I.	Primers	usea	1OL	KI-P	UK.

Primer set	Sequence	PCR product (bp)
SLC2A1		298
Sense	5′ TGA GCA TCG TGG CCA TCT TT 3′	
Antisense	3′ AA GCT ACT CTA GCG AAG GCC 5′	
SLC2A12		219
Sense	5′ AAG AGA GGG GAG ACG ACC TC 3′	
Antisense	3' CC TAG TCT CCT GCT CGG TAC 5'	
SLC38A1		187
Sense	5' GTG TAT GCT TTA CCC ACC ATT GC 3'	
Antisense	3′ TGA ACT GTA AGA TAC TGT TGC ACG 5′	
SLC38A2		141
Sense	5′ ACG AAA CAA TAA ACA CCA CCT TAA 3′	
Antisense	3′ A TAC GAC ACG GTT AAG ACT AGA 5′	
SLC38A4		152
Sense	5' TTG CCG CCC TCT TTG GTT AC 3'	
Antisense	3′ T GAT TGA CAC GGG TAA CAG GAG 5′	
PPARGC1A		191
Sense	5′ ACT GCA GGC CTA ACT CCA CCC AC 3′	
Antisense	3' CC CGG CCT CGT TAG GCT CAA 5'	
ESRRG		129
Sense	5′ TGG TCC CAA CTG GCT GTG CC 3′	
Antisense	3′ CC AAC GGC CAG CGT GTA CCT 5′	
SIRT1		143
Sense	5' AAA AAC CTC CAC GAA CAC AAA AA 3'	
Antisense	3′ TGC TTG GTC TAA AAG TGT GAC AAT C 5′	
NRF1		121
Sense	5′ TGT AGC TCC CTG CTG CAT CT 3′	
Antisense	3' GA GTG GAG GGA CAT TGC ACC 5'	
BCL-2		196
Sense	5' ATG TGT GTG GAG AGC GTC AAC C 3'	
Antisense	3′ CCG ACA GAG TCA TCT GAG GCA TGA 5′	
BAX		188
Sense	5' CAA ACT GGT GCT CAA GGC C 3'	
Antisense	3′ TAG AAA CAC CGC CCT CAC G 5′	
TP53		231
Sense	5′ ACT AAG CGA GCA CTG CCC AA 3′	
Antisense	3′ CAG TCA GAT GGA GGG CGG TA 5′	
ADIPOR1		71
Sense	5' TTC TTC CTC ATG GCT GTG ATG T 3'	
Antisense	3′ GCT TAA GGA CTC GCG AAG AA 5′	
ADIPOR2		76
Sense	5′ ATA GGG CAG ATA GGC TGG TTG A 3′	
Antisense	3' ACA TAC GAC GGG CCT AGG 5'	
TBP		132
Sense	5′ TGC ACA GGA GCC AAG AGT GAA 3′	
Antisense	3' CAC ATC ACA GCT CCC CAC CA 5'	
B2-MICROGLOBULIN		86
Sense	5′ TGC TGT CTC CAT GTT TGA TGT ATC T 3′	
Antisense	3' TCT CTG CTC CCC ACC TCT AAG T 5'	
RPL13A		
Sense	5′ CCT GGA GGA GAA GAG GAA AGA GA 3′	125
Antisense	3′ TTG AGG ACC TCT GTG TAT TTG TCA A 5′	

with hematoxylin. For each culture condition, digital images of DAB-stained placenta slides were obtained at 20× magnification using a whole-slide scanner (Aperio AT2; Leica Biosystems). Specific immunostaining over three representative fields was quantified using positive pixel count algorithm from Aperio ImageScope software (http://www.leicabiosystems.com/pathology-imaging/aperio-epathology/; Leica Biosystems).

#### Mitochondrial Staining

Villous CTs plated in a LabTech culture device were cultured in DMEM/ F12 medium supplemented with FCS (1%) in the presence or absence of adiponectin (25 or 250 ng/ml). After 48 h of treatment, the cells underwent mitochondrial staining with 100 nM Mitotracker Red CMXRos (Amax/ Emax: 579/599; Invitrogen) in DMEM/F12 medium supplemented with FCS (1%) for 30 min at 37°C. Cells were fixed in methanol for 10 min at 4°C and washed with PBS twice before cell nuclei were counterstained with Hoechst 33258 (1 µg/ml). As a negative control, villous CTs were processed in the absence of Mitotracker. Fluorescence was visualized with an inverted laser scanning confocal microscope (Leica white light laser TCS SP8-X; Leica selected, and Mitotracker intensity (arbitrary unit) was estimated using the postimaging procedure in ImageJ software (http://www.imagej.nih.gov/ij). Mitochondria:cell ratios were estimated by normalizing the mitochondrial staining intensity against the total number of nuclei inside each cellular event.

Microsystems). Five to ten cellular events per condition were randomly

# *Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*

Villous CTs were seeded in a 12-well culture plate and cultured in DMEM/ F12 medium supplemented with FCS (1%) in the presence or absence of adiponectin (25, 250, or 500 ng/ml) for 24 or 48 h. Total RNA (0.1  $\mu$ g) was extracted and reverse-transcribed as previously described [37]. Quantitative PCR was performed using the C1000 Thermal Cycler (CFX96 real-time system; BioRad) and the primer sets indicated in Table 1. The second derivative maximum method was used to automatically determine the crossing point for individual samples. The three reference genes (ribosomal protein L13A [RPL13A], TATA-binding protein [TBP], and B2-microglobulin) were chosen

TABLE 2. Small-interfering RNA sequences.

Target	Sequence				
ADIPOR1	5′ AAG GAC AAC GAC TAT CTG CTA 3′				
	5′ CTG GCT AAA GGA CAA CGA CTA 3′				
ADIPOR2	5′ ACC AAT TTA AGT GAA CAT TTA 3′				
	5' CGG CTC TCC TTG AAT AAG AAA 3'				

as previously described [27]. For each sample, the concentration ratios (target/ three reference mRNA) were calculated using CFX Manager (Version 3.0; BioRad) and expressed in arbitrary units. The data were expressed as percentages of the control situation. Calibration curves were log-linear over the quantification range, with correlation coefficients  $(r^2) > 0.99$  and efficiencies ranging from 1.8 to 2. The intra-assay variability of duplicate crossing-point values never exceeded 0.2 cycles, and the interassay variability (coefficient of variation) ranged from 1.9% to 4.1% for 8 to 10 runs of each transcript.

#### Lactate Production

Lactate release in the culture medium was measured using an automated enzymatic analysis (Roche). The level was normalized to 1  $\mu g$  of total proteins in the supernatant. Protein concentrations were measured according to Bradford with bovine serum albumin as the standard.

#### Human Chorionic Gonadotropin Secretion

The human chorionic gonadotropin (hCG) concentration was measured in the culture medium using an automated immune-chemiluminescence analysis with the total  $\beta$ hCG reagent kit (Abbot). In order to compare the hCG secretion, results were normalized to 1  $\mu$ g of total proteins. Protein concentration was measured as described above.

#### ATP Production

Cellular ATP production was assessed using an ATP assay kit (ab83355; Abcam) according to the manufacturer's instructions.

#### RNA Interference for ADIPOR1 and ADIPOR2

Two pairs of small-interfering RNAs (siRNAs) corresponding to different regions of each receptor gene were chemically synthesized by Qiagen. The sequences of the sense siRNAs are presented in Table 2. A fluorescently labeled, nonsilencing control siRNA (siNS) was useful for the optimization of transfection conditions and as a control for nonspecific silencing effects. For the knockdown experiments, villous CTs were plated in 12-well dishes at  $1.5 \times 10^6$  cells per well. Cells were transfected with siRNAs (25 nM/well) using a Lipofectamine RNAiMAX transfection reagent from Invitrogen according to

#### Statistics

Statistical analysis was performed on the raw data from 6 to 10 separate experiments. A nonparametric, paired Wilcoxon test was used to compare the effect of adiponectin concentration with the control situation (i.e., the absence of adiponectin) for a given exposure time.

#### RESULTS

#### Characterization of Human Villous CTs

To assess the purity of our CT preparation, cells were cultured in DMEM/F12 medium for 72 h. We then observed two characteristics of villous CTs: the expression of cytokeratin-7 (specific for glandular epithelium) and the formation of a syncytium. Villous CTs are able to fuse spontaneously after 48–72 h of culture in vitro [38]. The microscopy analysis (Fig. 1) revealed that isolated cells presented both these characteristics; 95% of the cells stained positive for cytokeratin-7. Moreover, our cell preparation was not significantly contaminated by the other major placental cell type (extravillous CTs) because the latter require an artificial matrix for growth in vitro [39]. In parallel, we studied syncytialization of villous CTs by measuring hCG production. Our results revealed that this hormonal production gradually increased during spontaneous differentiation (1113  $\pm$  271, 4232  $\pm$  910, and 10015  $\pm$  867 mUI/µg of protein after 24, 48, and 72 h of cell culture, respectively).

#### Effect of Adiponectin on Nutrient Transporters

We investigated the in vitro effect of adiponectin (25, 250, and 500 ng/ml) on GLUT1 and GLUT12 mRNA expressions (encoded by SLC2A1 and SLC2A12 genes, respectively) in villous CTs. After 24 h of treatment (Fig. 2A), a down-regulation of GLUT1 mRNA expression by adiponectin was observed for all concentrations tested with a maximal effect at 250 ng/ml (-50%). Similarly, adiponectin decreased GLUT12 mRNA expression at 25 ng/ml and 250 ng/ml (-36% for both concentrations). After 48 h of treatment (Fig. 2B), adiponectin significantly reduced GLUT1 mRNA expression at 250 ng/ml



FIG. 1. Characterization of human villous CTs. After isolation, CT cells were cultured in a DMEM/F12 medium for 72 h. Cytokeratin-7 staining was revealed as described in *Materials and Methods*. A) Negative staining control without primary antibody. B) Villous CT stained with anti-cytokeratin-7 antibody. Magnification  $\times 10$ .

#### ADIPONECTIN AND TROPHOBLAST ENERGY METABOLISM



FIG. 2. Effect of adiponectin on glucose transporter mRNA expression in human villous CTs. CT cells were exposed to adiponectin (25, 250, or 500 ng/ml) for 24 and 48 h. Total RNA were extracted after the treatment. GLUT1 and GLUT12 mRNA levels were quantified by RT-qPCR as described in *Materials and Methods*. A) Villous trophoblast cells were exposed to adiponectin for 24 h. The values are the mean  $\pm$  SEM from 13 separate experiments. B) Villous trophoblast cells were exposed to adiponectin for 48 h. The values are the mean  $\pm$  SEM from nine separate experiments.\**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; NS, nonsignificant (Wilcoxon test).

(-40%) with a maximal effect at 500 ng/ml (-50%). Finally, GLUT12 mRNA expression was also reduced by adiponectin at 25, 250, and 500 ng/ml (-18%, -33%, and 56%, respectively).

GLUT1 and GLUT12 mRNA / reference genes mRNA (% of control)

In parallel, we studied adiponectin's effect on SNAT1, SNAT2, and SNAT4 mRNA expressions (encoded by SLC38A1, SLC38A2, and SLC38A4 genes, respectively) in villous CTs. After 24 h of treatment (Fig. 3A), we found that adiponectin at 25 and 250 ng/ml significantly reduced SNAT1 mRNA expression (-36% and -49%, respectively). Adiponectin also reduced SNAT2 mRNA expression at 250 and 500 ng/ml (-33% and -46%, respectively). Concerning SNAT4 mRNA expression, we observed a very significant inhibition by adiponectin at only 250 ng/ml (-50%). However, in our experimental conditions, this negative effect of adiponectin on SNAT mRNA expressions did not seem to be confirmed at 48 h (Fig. 3B).

Finally, we performed immunohistochemistry experiments in order to confirm our previous results on mRNA expressions. As shown in Figure 4, GLUT1 and SNAT1 protein expressions are lower (-20% and -30%, respectively) in first-trimester placental cells when incubated with adiponectin (250 ng/ml) for 48 h.

#### Effect of Adiponectin on Energy Metabolism

To determine the effect of adiponectin on energy metabolism, we measured lactate release in cell supernatant and cellular ATP levels in the presence or absence of adiponectin (25 or 250 ng/ml). After 24 h of treatment (Fig. 5A), lactate levels were significantly lower in presence of adiponectin at 25 and 250 ng/ml (-16% and -22%, respectively). After 48 h, we observed a significant inhibition of lactate production by adiponectin at only 250 ng/ml (-16%). In contrast, we observed a significant positive effect of adiponectin (25 and 250 ng/ml) on total (mitochondrial and cytosolic) ATP levels (+30% and +24%, respectively) after 48 h of exposure (Fig. 5B).

# Effect of Adiponectin on Mitochondrial Function and Biogenesis

Most of the cell's ATP is produced by the mitochondria. To assess adiponectin's effect on mitochondrial activity in villous CTs, we used a specific, fluorescent Mitotracker Red CMX Ros to stain functional mitochondria. Confocal microscopy revealed that cells incubated with adiponectin (25 or 250 ng/ml) had significantly fewer active mitochondria than control cells (-44% and -62%, respectively) after 48 h of treatment (Fig. 6, A–E).

In parallel, the mRNA levels of four genes involved in the mitochondrial biogenesis process (PPARGC1A, ESRRG, SIRT1, and NRF1) were studied in villous CTs exposed to adiponectin (25 or 250 ng/ml) for 24 h. Under these experimental conditions, we observed a significant decrease in PPARGC1A, ESRRG, SIRT1, and NRF1 mRNA expressions (-39%, -47%, -48%, and -47%, respectively) in human villous CTs in the presence of adiponectin at 250 ng/ml (Fig. 6F).

#### Effect of Adiponectin on Cell Apoptosis

Lastly, we examined the effect of different adiponectin concentrations on the apoptotic process of villous CTs. After 24 h of treatment (Fig. 7A), adiponectin at 25, 250, and 500 ng/ ml, significantly increased BAX mRNA expression (+283%, +228%, and +513%, respectively) and TP53 mRNA expression (+98%, +209%, and +524%, respectively). After 48 h of

# DUVAL ET AL.



FIG. 3. Effect of adiponectin on amino acid transporters mRNA expression in human villous CTs. CT cells were exposed to adiponectin (25, 250, or 500 ng/ml) for 24 and 48 h. Total RNA were extracted after treatment. SNAT1, SNAT2, and SNAT4 mRNA levels were quantified by RT-qPCR as described in *Materials and Methods*. **A**) Villous trophoblast cells were exposed to adiponectin for 24 h. The values are the mean  $\pm$  SEM from 13 separate experiments. **B**) Villous trophoblast cells were exposed to adiponectin for 48 h. The values are the mean  $\pm$  SEM from nine separate experiments.\**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001; NS, nonsignificant (Wilcoxon test).



FIG. 4. Effect of adiponectin on GLUT1 and SNAT1 protein expression in human placenta. First-trimester human placenta were exposed to adiponectin (250 ng/ml) for 48 h. GLUT1 and SNAT1 protein immunostaining were revealed as described in *Materials and Methods*. Magnification  $\times$ 20. The figure shown is representative from among seven separate experiments. **A**, **B**) GLUT1 protein immunostaining: (**A**) control (0 ng/ml) and (**B**) adiponectin (250 ng/ml). **C–E**) SNAT1 protein immunostaining: (**C**) control (0 ng/ml), (**D**) adiponectin (250 ng/ml), and (**E**) negative control. **F**) Quantification of staining intensity. The area of GLUT1 and SNAT1 immunostaining was determined using Aperio ImageScope software. The values are the mean ± SEM from seven separate experiments. \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01 (Wilcoxon test).

#### ADIPONECTIN AND TROPHOBLAST ENERGY METABOLISM



FIG. 5. Effect of adiponectin on glucose intracellular utilization in human villous CTs. CT cells were exposed to adiponectin (25 or 250 ng/ml). Lactate and ATP production were measured after 24 and 48 h as described in *Materials and Methods*. **A**) Lactate production was measured after 24 and 48 h in cell supernatants. The values are the mean  $\pm$  SEM from 10 separate experiments. The control values were 4.29  $\pm$  0.92 and 3.31  $\pm$  0.89 mmol/µg protein for 24 and 48 h, respectively. **B**) Total ATP production was determined after 48 h. The values are the mean  $\pm$  SEM from seven separate experiments. The control values were 0.14  $\pm$  0.03 mM ATP. \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; NS, nonsignificant (Wilcoxon test).

treatment (Fig. 7B), adiponectin up-regulated BAX mRNA expression only at 250 and 500 ng/ml (+399% and +1004%, respectively) but increased TP53 mRNA expression at all concentrations tested (+48%, +73%, and +130%, respectively). However, in the same experimental conditions, adiponectin did not modify BCL-2 mRNA expression in human CT cells. Therefore, the BAX:BCL-2 ratio was significantly increased after 24 and 48 h adiponectin treatment.

Finally, we found that M30 immunostaining (reflecting caspase activity) was greater (+141%) in placental explants exposed to adiponectin (250 ng/ml) for 48 h than in controls (Fig. 8, A–E). A positive control with staurosporin (0.1  $\mu$ M) gave a comparable percentage of M30 immunostaining (+172%).

#### Effect of ADIPOR1 and ADIPOR2 Invalidation

In these experiments, we used two different siRNAs for each receptor. We observed a significant decrease of ADIPOR1 and ADIPOR2 mRNA expressions (-75% and -44%, respectively) after an invalidation of 48 h (Fig. 9A). Furthermore, as shown in Figure 9B, this partial suppression of ADIPOR1 and ADIPOR2 with siRNAs abolished, significantly decreased GLUT1 mRNA expression and increased TP53 mRNA expression by adiponectin.

#### DISCUSSION

It is well established that birth weight is positively correlated with the mother's body mass index before and during pregnancy [40]. Moreover, the association between abnormally small or abnormally large size at birth, and obesity later in life, indicates that the risk of metabolic disease corresponds to a transgenerational transmission [41]. Fetal growth is largely dependent on the delivery of oxygen and nutrients across the placenta. The placenta's ability to supply the fetus with nutrients is determined by a multitude of factors, including the mother's nutritional status, utero-placental blood flow, and the expression and function of trophoblast nutrient transporters [42]. However, the placenta is not merely a passive conduit for nutrients; there is a growing body of evidence to suggest that the placenta acts as a nutrient sensor, integrating signals from the mother and the fetus and adapting its development as a function of the maternal nutrient environment [43]. To better understand the mechanisms governing fetalmaternal exchanges, it is important to identify the maternal and fetal factors that regulate placental function. Of the various molecules secreted at the fetal-maternal interface, adiponectin appears to have a crucial role. Several studies have shown that maternal adiponectin levels are negatively correlated with birth weight [31, 32] and consequently reduce the risk of fetal



FIG. 6. Effect of adiponectin on mitochondrial activity in human villous CTs. **A**–**E**) CT cells were exposed to adiponectin (25 or 250 ng/ml) for 48 h. Mitochondrial activity was developed as described in *Materials and Methods*. Mitochondrial activity was analyzed by confocal microscopy. Magnification ×63. The figure shown is representative from among six separate experiments. **A**) Control (0 ng/ml). **B**) Adiponectin (25 ng/ml). **C**) Adiponectin (250 ng/ml). **D**) Negative control (absence of Mitotracker). **E**) Quantification of Mitotracker intensity. The area of mitochondrial staining per cell was determined using the ImageJ software available at http://imagej.nih.gov/ij. Results are the mean ± SEM of six separate experiments. **F**) CT cells were exposed to adiponectin (25 or 250 ng/ml) for 24 h. Total RNA was extracted. PPARGC1A, ESRRG, SIRT1, and NRF1 mRNA levels were quantified by RT-qPCR. The values are the mean ± SEM from eight separate experiments.\**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; NS, nonsignificant (Wilcoxon test).



FIG. 7. Effect of adiponectin on BAX, BCL-2 and TP53 expression in human villous CTs. CT cells were exposed to adiponectin (25, 250, or 500 ng/ml) for 24 and 48 h. Total RNA were extracted after the treatment. BAX, BCL-2, and TP53 mRNA levels were quantified by RT-qPCR as described in *Materials and Methods*. A) Villous trophoblast cells were exposed to adiponectin for 24 h. The values are the mean  $\pm$  SEM from 13 separate experiments. B) Villous trophoblast cells were exposed to adiponectin for 48 h. The values are the mean  $\pm$  SEM from nine separate experiments.\**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; NS, nonsignificant (Wilcoxon test).

#### ADIPONECTIN AND TROPHOBLAST ENERGY METABOLISM



FIG. 8. Effect of adiponectin on caspase activity in human placenta. First-trimester human placenta were exposed to adiponectin (250 ng/ml) or staurosporin (0.1  $\mu$ M) for 48 h. Caspase activity was evaluated by M30 immunostaining as described in *Materials and Methods*. Magnification ×20. The figure shown is representative from among eight separate experiments. **A**) Control (0 ng/ml). **B**) Adiponectin (250 ng/ml). **C**) Staurosporin 0.1  $\mu$ M (positive control). **D**) Negative control. **E**) Quantification of M30 immunostaining. The area of M30 staining was determined using Aperio ImageScope software. The values are the mean ± SEM from eight separate experiments. \*\*P < 0.001 (Wilcoxon test).

macrosomia [44]. However, the underlying molecular mechanisms have not been fully elucidated. In this context, we studied the in vitro effect of adiponectin on the expression of some nutrient transporters and on mitochondrial functions in human villous CTs from first-trimester placentas. In the present study, human recombinant adiponectin effects were observed with concentrations (25–500 ng/ml) much lower than those found in normal human circulation or in cord blood during gestation [45, 46]. However, the human recombinant adiponectin used in this work contains mainly the high molecular weight form [47], known as the active form of adiponectin [48]. Moreover, adiponectin is commonly used for in vitro experiments with placental and other cell types at these subphysiological concentrations [27, 29, 30, 49].

In contrast to the well-characterized insulin-sensitizing actions of adiponectin, our results clearly show that adiponectin



FIG. 9. Role of specific adiponectin receptors on adiponectin effects in human villous CTs. CT cells were cultured for 48 h in presence of 25 nM siADIPOR1/R2 or 10 nM siNS. Total RNA were extracted after treatment and quantified by RT-qPCR as described in *Materials and Methods* **A**) ADIPOR1 and ADIPOR2 mRNA levels were measured in transfected cells. Results are the mean  $\pm$  SEM of six separate experiments. **B**) CT cells transfected with siADIPOR1/R2 or siNS were exposed to adiponectin (250 ng/ml). GLUT1 and TP53 mRNA levels were quantified by RT-qPCR. Results are the mean  $\pm$  SEM of eight separate experiments. \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; NS, nonsignificant (Wilcoxon test).

inhibits GLUT1 and GLUT12 expressions, the two major glucose transporter isoforms in first-trimester human villous CTs [50]. This finding agrees with Caminos et al.'s [28] report of significant down-regulation of GLUT3 mRNA expression in rat placentas after chronic adiponectin treatment during gestation. Consequently, adiponectin exerts an atypical effect on glucose homeostasis in placental tissue.

Moreover, we observed the specific down-regulation of SNAT1, SNAT2, and SNAT4 expressions, the principal amino acid transporters in placenta, in villous CTs exposed to adiponectin [51]. These data disagree with previous studies of human CTs from term placentas, which found that adiponectin exposure affects SNAT1, SNAT2, and SNAT4 expressions (only in the presence of insulin) [34, 35]. However, in vivo experiments have shown that chronic infusion of adiponectin in pregnant mice was associated with downregulation of placental amino acid transporters and a 19% drop in fetal weight [33]. Taken as a whole, these observations suggest that the effects of adiponectin on placental amino acid transport seem to be 1) gestational-age-dependent as already shown by our previous studies of the adiponectin's prodifferentiation properties [29] and 2) insulin-independent (at least in part) during the first trimester. Overall, human adiponectin seems to down-regulate placental nutrient transport during pregnancy.

Because the majority of adiponectin's metabolic effects are mediated by functional mitochondria, we next looked at this organelle's involvement in adiponectin's placental actions. First, our results demonstrate that adiponectin is associated with greater total ATP production and lower lactate production by villous CTs. Hence, adiponectin might promote aerobic glycolysis and energy production in villous CTs in order to support the placenta's high energy needs. Further experiments will be needed to complete such observations and to specify adiponectin's action on glucose metabolism in placental cells. Second, we showed that adiponectin surprisingly inhibits placental mitochondrial biogenesis by 1) reducing the expression of the main genes involved in this process (PPARGC1A, ESRRG, SIRT1, and NRF1) [52] and 2) limiting the number of functional mitochondria in villous CT cells. Our results disagree with other studies describing adiponectin as a hormone that activates mitochondrial function in organs with high metabolic activity (such as muscle and liver) [10, 13, 14]. Once again, our results describe an atypical action of adiponectin in human placenta.

Here, we found that adiponectin is associated with greater ATP production and lower concomitant mitochondrial biogenesis (i.e., fewer functional mitochondria). These paradoxical effects revealed a possible apoptotic role for adiponectin in human villous CTs. It is well-known that higher ATP production and lower mitochondrial biogenesis are observed during apoptosis [53, 54]. In this context, we studied adiponectin's effects on the apoptotic potential of villous CTs. Our results demonstrate that adiponectin up-regulates the expression of the pro-apoptotic TP53 gene and increases the BAX:BCL-2 ratio, a sign of cell apoptosis. Moreover, exposure to adiponectin was associated with more intense M30 immunostaining, suggesting that this adipokine has a pro-apoptotic role via caspase activity.

Moreover, silencing the ADIPOR1 and ADIPOR2 genes suppressed adiponectin effect on TP53 and also GLUT1 mRNA expressions. These results suggest a critical implication of ADIPOR in adiponectin regulation of nutrient transport and apoptosis in human villous CT cells. These results are in accordance with our previous observations describing that trophoblastic cells did not express the novel characterized adiponectin receptor, T-cadherin [27].

Various studies have attempted to determine adiponectin's involvement in some pathologies of pregnancy and in particular IUGR, characterized by low fetal weight, small length, and small head circumference [55]. Moreover, abnormal maternal levels of adiponectin are generally observed in the context of IUGR. More precisely, maternal adiponectin concentration is lower in IUGR compared with appropriate gestational age fetuses [56]. It has also been reported that IUGR placentas present 1) abnormal mitochondrial ultrastructure, content, and function [57] and 2) marked trophoblast apoptosis and thus hypotrophic placental tissue [58, 59]. Our results showing an apoptotic effect of adiponectin in trophoblastic cells are in accordance with a previous report in which the placental adiponectin-ADIPOR1 interaction induced cell apoptosis in a context of pre-eclampsia with IUGR [60]. Adiponectin's pro-apoptotic effect has already been described in various tissues and cell types [16-18]. Placental cells consequently constitute a new example of adiponectin's decisive role in cell death. Lastly, a recent study performed in our laboratory demonstrated that the placental mitochondrial DNA content from human third-trimester placenta is directly correlated with fetal weight [21]. In the present study, we found that adiponectin modulates mitochondrial biogenesis and apoptosis in human placenta. Hence, we hypothesize that this adipokine has a causative role in the regulation of fetal growth by modulating nutrient transport and mitochondrial functions. Given the demonstrated importance of this hormone in maintaining energy homeostasis in other biological systems, there is a real need to better understand the effects of adiponectin on placental metabolism. We are currently performing experiments concerning this last point.

In conclusion, better knowledge of the underlying molecular mechanisms will enhance our understanding of how adiponectin controls placental development in normal pregnancies and also in cases of IUGR and macrosomia. In turn, this should enable mothers and children affected by these disorders to receive better care.

#### ACKNOWLEDGMENT

The authors gratefully acknowledge the Department of Gynecology and Obstetrics, CHI de Poissy-Saint Germain, for their courtesy in making first-trimester human placental tissue available. Immunofluorescence image acquisition and analysis were performed on CYMAGES platform and immunoperoxidase image acquisition and analysis were performed on immunohistochemistry platform, both supported by the community of Saint Quentin en Yvelines and the University of Versailles Saint Quentin en Yvelines.

#### REFERENCES

- Kern PA, Di Gregorio GB, Lu T, Rassouli N, Ranganathan G. Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression. Diabetes 2003; 52(7):1779–1785.
- Hada Y, Yamauchi T, Waki H, Tsuchida A, Hara K, Yago H, Miyazaki O, Ebinuma H, Kadowaki T. Selective purification and characterization of adiponectin multimer species from human plasma. Biochem Biophys Res Commun 2007; 356(2):487–493.
- Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. Nature 2003; 423(6941):762–769.
- Hug C, Wang J, Ahmad NS, Bogan JS, Tsao T-S, Lodish HF. T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/ adiponectin. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101(28):10308–10313.
- Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, et al.

Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. Circulation 2000; 102(11):1296–1301.

- Campos DB, Palin M-F, Bordignon V, Murphy BD. The "beneficial" adipokines in reproduction and fertility. Int J Obes (Lond) 2008; 32(2): 223–231.
- Yamauchi T, Hara K, Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Froguel P, Nagai R, Kadowaki T. Dual roles of adiponectin/Acrp30 in vivo as an anti-diabetic and anti-atherogenic adipokine. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord 2003; 3(4):243–254.
- Fu Y, Luo N, Klein RL, Garvey WT. Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. J Lipid Res 2005; 46(7):1369–1379.
- Ceddia RB, Somwar R, Maida A, Fang X, Bikopoulos G, Sweeney G. Globular adiponectin increases GLUT4 translocation and glucose uptake but reduces glycogen synthesis in rat skeletal muscle cells. Diabetologia 2005; 48(1):132–139.
- Qiao L, Kinney B, Yoo HS, Lee B, Schaack J, Shao J. Adiponectin increases skeletal muscle mitochondrial biogenesis by suppressing mitogen-activated protein kinase phosphatase-1. Diabetes 2012; 61(6): 1463–1470.
- Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMPactivated protein kinase. Nat Med 2002; 8(11):1288–1295.
- Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L. Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. J Clin Invest 2001; 108(12):1875–1881.
- Iwabu M, Yamauchi T, Okada-Iwabu M, Sato K, Nakagawa T, Funata M, Yamaguchi M, Namiki S, Nakayama R, Tabata M, Ogata H, Kubota N, et al. Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1alpha and mitochondria by Ca(2+) and AMPK/SIRT1. Nature 2010; 464(7293):1313–1319.
- Handa P, Maliken BD, Nelson JE, et al. Reduced adiponectin signaling due to weight gain results in nonalcoholic steatohepatitis through impaired mitochondrial biogenesis. Hepatology 2014; 60(1):133–145.
- Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. Nat Rev Immunol 2006; 6(10):772–783.
- Dieudonne M-N, Bussiere M, Dos Santos E, Leneveu M-C, Giudicelli Y, Pecquery R. Adiponectin mediates antiproliferative and apoptotic responses in human MCF7 breast cancer cells. Biochem Biophys Res Commun 2006; 345(1):271–279.
- Dos Santos E, Benaitreau D, Dieudonne M-N, Leneveu M-C, Serazin V, Giudicell Y, Pecquery R. Adiponectin mediates an antiproliferative response in human MDA-MB 231 breast cancer cells. Oncol Rep 2008; 20(4):971–977.
- Cong L, Gasser J, Zhao J, Yang B, Li F, Zhao AZ. Human adiponectin inhibits cell growth and induces apoptosis in human endometrial carcinoma cells, HEC-1-A and RL95 2. Endocr Relat Cancer 2007; 14(3):713–720.
- Nepal S, Park P-H. Regulatory role of autophagy in globular adiponectininduced apoptosis in cancer cells. Biomol Ther (Seoul) 2014; 22(5): 384–389.
- Lunghi L, Ferretti ME, Medici S, Biondi C, Vesce F. Control of human trophoblast function. Reprod Biol Endocrinol 2007; 5(1):6.
- Poidatz D, Dos Santos E, Duval F, Moindjie H, Serazin V, Vialard F, De Mazancourt P, Dieudonné M-N. Involvement of estrogen-related receptor-γ and mitochondrial content in intrauterine growth restriction and preeclampsia. Fertil Steril 2015; 104:483–490.
- Chabrolle C, Tosca L, Ramé C, Lecomte P, Royère D, Dupont J. Adiponectin increases insulin-like growth factor I-induced progesterone and estradiol secretion in human granulosa cells. Fertil Steril 2009; 92(6): 1988–1996.
- Ledoux S, Campos DB, Lopes FL, Dobias-Goff M, Palin M-F, Murphy BD. Adiponectin induces periovulatory changes in ovarian follicular cells. Endocrinology 2006; 147(11):5178–5186.
- Ma K, Cabrero A, Saha PK, Kojima H, Li L, Chang BH-J, Paul A, Chan L. Increased beta -oxidation but no insulin resistance or glucose intolerance in mice lacking adiponectin. J Biol Chem 2002; 277(38): 34658–34661.
- 25. Combs TP, Pajvani UB, Berg AH, Lin Y, Jelicks LA, Laplante M, Nawrocki AR, Rajala MW, Parlow AF, Cheeseboro L, Ding Y-Y, Russell RG, et al. A transgenic mouse with a deletion in the collagenous domain of adiponectin displays elevated circulating adiponectin and improved insulin sensitivity. Endocrinology 2004; 145(1):367–383.
- Takemura Y, Osuga Y, Yamauchi T, Kobayashi M, Harada M, Hirata T, Morimoto C, Hirota Y, Yoshino O, Koga K, Yano T, Kadowaki T, et al.

Expression of adiponectin receptors and its possible implication in the human endometrium. Endocrinology 2006; 147:3203–3210.

- Benaitreau D, Dieudonné M-N, Dos Santos E, Leneveu M-C, Mazancourt P de, Pecquery R. Antiproliferative effects of adiponectin on human trophoblastic cell lines JEG-3 and BeWo. Biol Reprod 2009; 80(6): 1107–1114.
- Caminos JE, Nogueiras R, Gallego R, Bravo S, Tovar S, García-Caballero T, Casanueva FF, Diéguez C. Expression and regulation of adiponectin and receptor in human and rat placenta. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90(7):4276–4286.
- Benaitreau D, Dos Santos E, Leneveu M-C, De Mazancourt P, Pecquery R, Dieudonné M-N. Adiponectin promotes syncytialisation of BeWo cell line and primary trophoblast cells. Reprod Biol Endocrinol 2010; 8(1):128.
- Benaitreau D, Dos Santos E, Leneveu M-C, Alfaidy N, Feige J-J, de Mazancourt P, Pecquery R, Dieudonné M-N. Effects of adiponectin on human trophoblast invasion. J Endocrinol 2010; 207(1):45–53.
- Aye ILMH, Powell TL, Jansson T. Review: adiponectin-the missing link between maternal adiposity, placental transport and fetal growth? Placenta 2013; 34(Suppl):S40–S45.
- 32. Atègbo J-M, Grissa O, Yessoufou A, Hichami A, Dramane KL, Moutairou K, Miled A, Grissa A, Jerbi M, Tabka Z, Khan NA. Modulation of adipokines and cytokines in gestational diabetes and macrosomia. J Clin Endocrinol Metab 2006; 91(10):4137–4143.
- 33. Rosario FJ, Schumacher MA, Jiang J, Kanai Y, Powell TL, Jansson T. Chronic maternal infusion of full-length adiponectin in pregnant mice down-regulates placental amino acid transporter activity and expression and decreases fetal growth. J Physiol 2012; 590(Pt 6):1495–1509.
- Jones HN, Jansson T, Powell TL. Full-length adiponectin attenuates insulin signaling and inhibits insulin-stimulated amino acid transport in human primary trophoblast cells. Diabetes 2010; 59(5):1161–1170.
- Aye ILMH, Gao X, Weintraub ST, Jansson T, Powell TL. Adiponectin inhibits insulin function in primary trophoblasts by PPARα-mediated ceramide synthesis. Mol Endocrinol 2014; 28(4):512–524.
- Handschuh K, Guibourdenche J, Tsatsaris V, Guesnon M, Laurendeau I, Evain-Brion D, Fournier T. Human chorionic gonadotropin expression in human trophoblasts from early placenta: comparative study between villous and extravillous trophoblastic cells. Placenta 2006; 28(2-3): 175–184.
- Machinal-Quélin F, Dieudonné MN, Leneveu MC, Pecquery R, Giudicelli Y. Proadipogenic effect of leptin on rat preadipocytes in vitro: activation of MAPK and STAT3 signaling pathways. Am J Physiol Cell Physiol 2002; 282(4):C853–C863.
- Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM, Strauss JF. Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. Endocrinology 1986; 118(4):1567–1582.
- Tarrade A, Lai Kuen R, Malassiné A, Tricottet V, Blain P, Vidaud M, Evain-Brion D. Characterization of human villous and extravillous trophoblasts isolated from first trimester placenta. Lab Investig 2001; 81(9):1199–1211.
- Hull HR, Dinger MK, Knehans AW, Thompson DM, Fields DA. Impact of maternal body mass index on neonate birthweight and body composition. Am J Obstet Gynecol 2008. 198(4):416.
- Oken E, Gillman MW. Fetal origins of obesity. Obes Res 2003; 11(4): 496–506.
- Jansson T, Myatt L, Powell TL. The role of trophoblast nutrient and ion transporters in the development of pregnancy complications and adult disease. Curr Vasc Pharmacol 2009; 7(4):521–533.
- Jansson T, Powell TL. Human placental transport in altered fetal growth: does the placenta function as a nutrient sensor?-a review. Placenta 2006; 27(Suppl A):S91–S97.
- 44. Nanda S, Akolekar R, Sarquis R, Mosconi AP, Nicolaides KH. Maternal serum adiponectin at 11 to 13 weeks of gestation in the prediction of macrosomia. Prenat Diagn 2011; 31(5):479–483.
- Corbetta S, Bulfamante G, Cortelazzi D, Barresi V, Cetin I, Mantovani G, Bondioni S, Beck-Peccoz P, Spada A. Adiponectin expression in human fetal tissues during mid- and late gestation. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90(4):2397–2402.
- Kajantie E, Hytinantti T, Hovi P, Andersson S. Cord plasma adiponectin: a 20-fold rise between 24 weeks gestation and term. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89(8):4031–4036.
- Bub JD, Miyazaki T, Iwamoto Y. Adiponectin as a growth inhibitor in prostate cancer cells. Biochem Biophys Res Commun 2006; 340(4): 1158–1166.
- Kobayashi H, Ouchi N, Kihara S, Walsh K, Kumada M, Abe Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin. Circ Res 2004; 94(4):e27–e31.
- 49. Bråkenhielm E, Veitonmäki N, Cao R, Kihara S, Matsuzawa Y,

Zhivotovsky B, Funahashi T, Cao Y. Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101(8):2476–2481.

- Lager S, Powell TL. Regulation of nutrient transport across the placenta. J Pregnancy 2012; 2012:179827.
- Desforges M, Mynett KJ, Jones RL, Greenwood SL, Westwood M, Sibley CP, Glazier JD. The SNAT4 isoform of the system A amino acid transporter is functional in human placental microvillous plasma membrane. J Physiol 2009; 587(Pt 1):61–72.
- 52. Jornayvaz FR, Shulman GI. Regulation of mitochondrial biogenesis. Essays Biochem 2010; 47:69–84.
- Zamaraeva MV, Sabirov RZ, Maeno E, Ando-Akatsuka Y, Bessonova SV, Okada Y. Cells die with increased cytosolic ATP during apoptosis: a bioluminescence study with intracellular luciferase. Cell Death Differ 2005; 12(11):1390–1397.
- Gottlieb E, Armour SM, Harris MH, Thompson CB. Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis. Cell Death Differ 2003; 10(6):709–717.
- 55. O'Connor C, Stuart B, Fitzpatrick C, Turner MJ, Kennelly MM. A review

of contemporary modalities for identifying abnormal fetal growth. J Obstet Gynaecol 2013; 33(3):239–245.

- 56. Kyriakakou M, Malamitsi-Puchner A, Militsi H, Boutsikou T, Margeli A, Hassiakos D, Kanaka-Gantenbein C, Papassotiriou I, Mastorakos G. Leptin and adiponectin concentrations in intrauterine growth restricted and appropriate for gestational age fetuses, neonates, and their mothers. Eur J Endocrinol 2008; 158(3):343–348.
- Lattuada D, Colleoni F, Martinelli A, Garretto A, Magni R, Radaelli T, Cetin I. Higher mitochondrial DNA content in human IUGR placenta. Placenta 2008; 29(12):1029–1033.
- Sharp AN, Heazell AEP, Crocker IP, Mor G. Placental apoptosis in health and disease. Am J Reprod Immunol 2010; 64(3):159–169.
- Straszewski-Chavez SL, Abrahams VM, Mor G. The role of apoptosis in the regulation of trophoblast survival and differentiation during pregnancy. Endocr Rev 2005; 26(7):877–897.
- 60. Jarvenpaa J, Vuoristo JT, Santaniemi M, Ukkola O, Savolainen E-R, Jääskeläinen M, Tapanainen JS, Kesäniemi A, Ryynanen M. Adiponectin induced placental cell apoptosis could be mediated via the ADIPOR1receptor in pre-eclampsia with IUGR. J Perinat Med 2009; 37(3):257–262.

# PARTIE 4 DISCUSSION & PERSPECTIVES

# A. Présentation des résultats de thèse

Les données de la littérature suggèrent que l'adiponectine pourrait contrôler négativement la croissance fœtale. Cependant, les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués ne sont pas décrits à ce jour. Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes donc intéressés aux **rôles de l'adiponectine à l'interface fœto-maternelle humaine au cours du premier trimestre de grossesse**. Nous avons ainsi observé que cette adipokine influence le développement et la physiologie de l'endomètre et du placenta.

Dans les cellules endométriales stromales, nous avons démontré que l'adiponectine exerce des effets anti-différenciant et anti-invasif (article 1). Ainsi, nous pouvons supposer que des taux plasmatiques anormalement élevés de cette adipokine chez la femme participent à la mise en place de pathologies associées à un défaut de la **décidualisation** et/ou de l'**invasion trophoblastique**. Nous avons confirmé cette hypothèse chez des femmes souffrant de **fausses-couches spontanées à répétition**, pour lesquelles nous avons observé une adiponectinémie significativement augmentée comparativement aux femmes fertiles (article 2). En revanche, l'adiponectine semble favoriser l'accumulation et la sécrétion de **glycogène** dans les cellules stromales, créant ainsi un environnement endométrial bénéfique au développement fœtal précoce.

Nous avons démontré que l'adiponectine diminue l'endocytose du glycogène par <u>les cellules</u> <u>trophoblastiques villeuses</u> issues de placentas précoces (obtenus avant l'oxygénation de la chambre intervilleuse). Ces résultats suggèrent que l'adiponectine pourrait contrôler négativement la **nutrition histiotrophe** du fœtus (article 3). De plus, nous avons décrit que dans les placentas plus tardifs (> 10 S.A), l'adiponectine diminue la **nutrition hémotrophe**. L'adiponectine dérégule également le **métabolisme énergétique**, plus particulièrement en diminuant le stock de mitochondries actives. Enfin, l'adiponectine exerce un **effet pro-apoptotique** dans les cellules trophoblastiques (article 4).

Ainsi, l'ensemble de ces résultats permet de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans les effets négatifs de l'adiponectine sur la **croissance fœtale**. En conclusion, l'adiponectine pourrait intervenir dans les premières étapes de la grossesse en contrôlant 1) la maturation d'un endomètre fonctionnel et 2) en contrôlant le transfert transplacentaire de nutriments.



L'ensemble des résultats de cette thèse est résumé dans le schéma bilan présenté en Figure 49.

Figure 49. Schéma bilan des résultats.

# B. L'adiponectine : un acteur clé de l'implantation embryonnaire

L'implantation embryonnaire nécessite la mise en place d'un **dialogue paracrine efficace** entre les cellules trophoblastiques et les cellules endométriales. Chez l'Homme, les données de la littérature sont de plus en plus détaillées concernant le rôle de l'adiponectine dans le placenta. En revanche, l'action de l'adiponectine dans l'endomètre est peu décrite.

Au cours de cette thèse, nous avons donc été l'une des premières équipes à étudier les effets directs *in vitro* de l'adiponectine dans les cellules endométriales humaines. En effet, une seule étude réalisée en 2013, montre que l'adiponectine réduit la viabilité de ces cellules (Bohlouli *et al.*, 2013). Ces résultats suggèrent que l'adiponectine régule le cycle cellulaire des cellules endométriales. Dans ce contexte, nous avons souhaité étudier les effets de l'adiponectine au cours de la décidualisation, étape clé de la différenciation endométriale et par conséquent de l'implantation embryonnaire.

Nous avons tout d'abord clairement démontré que l'adiponectine inhibe l'expression ou la sécrétion de différents marqueurs de décidualisation (prolactine, IGFBP-1 et connexine-43) suggérant que cette adipokine **freine la différenciation** *in vitro* des cellules stromales de l'endomètre en cellules déciduales.

De plus en plus, il est suggéré qu'une **réaction déciduale exacerbée est néfaste** pour l'établissement de la grossesse. En effet, une décidualisation excessive serait à l'origine d'une réduction de la durée de la fenêtre implantatoire. Ce phénomène provoquerait un asynchronisme entre l'embryon et l'endomètre, augmentant le risque d'une implantation retardée, responsable d'une perte embryonnaire (Farquharson/Stephenson, 2010). Ainsi, par son action anti-différenciante au cours de la décidualisation, l'adiponectine contribuerait à limiter ce phénomène.

Nous avons ensuite étudié les effets de l'adiponectine sur le contrôle de l'invasion trophoblastique par les cellules déciduales humaines. Ce travail nous a permis de démontrer que l'adiponectine (i) diminue l'activité des métalloprotéases MMP-2 et MMP-9 et (ii) augmente l'expression de l'inhibiteur des métalloprotéases TIMP-3 dans les cellules déciduales. Ces résultats suggèrent que l'adiponectine exerce un **effet anti-invasif dans l'endomètre**. De manière intéressante, nous avons précédemment démontré au laboratoire que l'adiponectine exerce un **rôle pro-invasif dans les cellules trophoblastiques** extravilleuses humaines. Ce contrôle de l'invasion trophoblastique est réalisé *via* la régulation de la balance MMP-2,-9/TIMP-2 (Benaitreau *et al.*, 2010a). Ainsi, il apparait, par cette action opposée dans l'endomètre et le placenta, que l'adiponectine est une cytokine régulatrice majeure du processus d'invasion trophoblastique. Par ce double contrôle, l'adiponectine pourrait donc contribuer à éviter une invasion trop profonde (placenta accreta) ou inversement trop superficielle (pré-éclampsie).

## 1. L'adiponectine : un biomarqueur du placenta accreta ?

Le placenta accreta correspond à une forme d'invasion trophoblastique excessive. Dans cette pathologie, le placenta envahit l'utérus profondément, se liant ainsi anormalement au myomètre. Une décidualisation déficiente semble également être impliquée dans la physiopathologie du placenta accreta (Garmi and Salim, 2012). Les effets anti-différenciants et anti-invasifs de l'adiponectine dans l'endomètre observés au cours de nos travaux suggèrent donc qu'une altération de l'expression de

l'adiponectine et/ou une dérégulation du signal adiponectine à l'interface fœto-maternelle pourrait participer au développement de cette pathologie.

Nous souhaitons donc, en collaboration avec le CHIPS, étudier l'expression de l'adiponectine et de ses deux récepteurs spécifiques (ADIPOR1 et ADIPOR2) dans l'endomètre et le placenta de femmes normo-pondérées qui ont développé un placenta accreta. Cela s'effectuera par RT-qPCR et immunohistochimie. Parallèlement, le dosage de l'adiponectinémie chez ces femmes sera réalisé par un test ELISA et les polymorphismes du gène codant cette adipokine seront analysés par une approche similaire à celle décrite dans l'article 2, concernant les femmes souffrant de fausses-couches spontanées à répétition. Ainsi, nous mettrons en évidence la potentielle implication du système adiponectine dans la physiopathologie du placenta accreta.

La décidualisation du compartiment stromal de l'endomètre constitue un phénomène primordial lors de l'initiation de la grossesse. Cependant, la réceptivité des cellules endométriales épithéliales jouent elle aussi un rôle majeur, en contrôlant l'implantation embryonnaire. Un défaut de réceptivité peut ainsi être à l'origine de pathologies telles que les échecs répétés d'implantation. Afin de compléter nos données, il serait intéressant d'étudier le rôle de l'adiponectine dans les cellules épithéliales endométriales. Ce type cellulaire est directement impliqué dans les phases d'apposition et d'adhésion du blastocyste à l'endomètre. Des études précédentes ont décrit que certaines cytokines impliquées dans le processus de décidualisation, comme l'interleukine-11 ou le LIF, modulent également la réceptivité de l'endomètre (Marwood *et al.*, 2009). Les prochains travaux du laboratoire concerneront donc l'implication de l'adiponectine au cours de la mise en place de la réceptivité utérine à l'embryon.

# 2. Etude de la réceptivité utérine *in vitro*

Nous souhaitons étudier le rôle de l'adiponectine sur l'expression de différents marqueurs de la réceptivité endométriale, tels que les intégrines  $\alpha 1$ ,  $\alpha v$  et  $\beta 3$  et les récepteurs membranaires CD44 et CD55 (Carson *et al.*, 2000). De la même façon, l'expression de protéines anti-adhésion telles que les mucines (MUC-1 et MUC-16) et l'apolipoprotéine A-I, sera elle aussi mesurée (Brosens *et al.*, 2010;

Aplin and Ruane, 2017). De nombreuses voies de signalisation impliquées dans la réceptivité utérine ont été décrites. C'est notamment le cas de la voie ERK, de la voie PI3K et de la voie JAK/STAT (Trévoux, 2009). Il serait donc intéressant d'identifier la cascade de signaux intracellulaires et les facteurs de transcription activés par l'adiponectine au sein des cellules épithéliales endométriales.

Pour cela, nous avons mis au point au cours de cette thèse, un protocole d'isolement des cellules épithéliales endométriales. Celles-ci ont été obtenues à partir de biopsies d'endomètre réalisées chez des femmes effectuant un diagnostic de fertilité au CHIPS. Les prélèvements ont été réalisés au cours de la fenêtre implantatoire.

Des expérimentations d'immunocytochimie ont ainsi démontré que la grande majorité des cellules isolées étaient positives pour la pan-cytokératine (marqueur épithélial) et majoritairement négatives pour la vimentine (marqueur stromal). Ces résultats suggèrent que les cellules isolées sont de type épithélial (**Figure 50**). L'analyse de la pureté cellulaire par une approche de cytométrie en flux a permis d'estimer celle-ci à 90%.



Figure 50. Isolement des cellules endométriales épithéliales.

Cette étude concernant le rôle direct de l'adiponectine sur la **réceptivité** des cellules endométriales humaines complètera nos travaux réalisés sur les effets de cette adipokine au cours de la **décidualisation** des cellules stromales. **Ainsi, à terme, nous pourrons définir le rôle de l'adiponectine sur la qualité endométriale humaine.** 

# 3. Etude de la réceptivité utérine in vivo

L'infertilité est considérée aujourd'hui comme un véritable **problème de santé publique**. En effet, il est estimé qu'un couple sur six présente des problèmes à concevoir un enfant, engendrant une augmentation constante des demandes de prise en charge en assistance médicale à la procréation (Farquhar *et al.*, 2015). Chez l'Homme, pour des raisons pratiques et éthiques, l'étude d'une infertilité associée à un défaut de réceptivité endométriale est difficile. La majorité des études sont donc réalisées *in vivo* et *in vitro* chez la souris ou le rat. En effet, ces deux espèces présentent une phase de maturation endométriale semblable à l'espèce humaine.

Dans le cadre du rapprochement entre l'EA-7404 et de l'UMR-1198 de l'INRA de Jouy-en-Josas, nous nous sommes intéressés aux liens entre l'adiponectine et la réceptivité utérine dans un **modèle bovin**. En effet, le déclin de la fertilité observé au cours des dernières décennies n'est pas propre à l'espèce humaine et est observé chez de nombreuses espèces animales, notamment dans le **secteur agronomique**. Plus précisément, les exploitations laitières font face à des enjeux économiques importants suite à la baisse de productivité des espèces de vaches laitières. En effet, il est observé depuis 1950, une augmentation de la production laitière accompagnée d'une réduction du taux de gestation, notamment chez la **race Holstein**. Ainsi, les éleveurs ont recourt à l'insémination artificielle à l'origine d'un coût économique supplémentaire (González-Recio *et al.*, 2004). La race Holstein présente l'intérêt de nous fournir deux modèles d'étude.

**Premier modèle**. Au sein d'un élevage, les femelles se différencient par leur capacité à accueillir un embryon et à maintenir la gestation jusqu'à son terme. On différencie ainsi les « **mauvaises receveuses** » des « **bonnes receveuses** ». Ces différences pourraient s'expliquer par des désordres hormonaux ou des anomalies du cycle œstral qui compromettent les capacités reproductrices de la vache (Hasler, 2010). L'étude du système adiponectine au sein de ces deux groupes d'animaux pourrait permettre de mettre en évidence le lien entre cette adipokine et la mise en place de la réceptivité utérine. Nous souhaitons donc étudier l'expression de l'adiponectine et de ses récepteurs spécifiques (ARNm et protéines) dans les endomètres issus de bonnes receveuses et de mauvaises receveuses.

**Deuxième modèle**. Malgré l'utilisation des technologies de procréation assistée au sein des élevages, les pertes embryonnaires précoces (au cours du premier mois de gestation) sont très fréquentes. Elles sont ainsi estimées à 43% des gestations totales (Diskin and Morris, 2008). Cette hypofertilité semble donc se caractériser par un défaut d'implantation embryonnaire. L'hypofertilité de la vache laitière s'expliquerait notamment par un déficit énergétique inhérent à la période de lactation, rendant une nouvelle gestation impossible. La vache favorise la production de lait au détriment de ses performances reproductrices (Lucy, 2001). L'homéostasie métabolique est sous le contrôle du tissu adipeux et de la sécrétion des adipokines. En effet, il est suggéré que les adipokines pourraient impacter directement la qualité endométriale *via* leur action sur le métabolisme général (Sumner-Thomson *et al.*, 2011; Contreras *et al.*, 2016, 2017).

En collaboration avec l'UMR-1198 de l'INRA de Jouy-en-Josas, nous avons, au cours de cette thèse, étudié l'expression de l'adiponectine et de ses récepteurs ADIPOR1 et ADIPOR2 dans les endomètres de vaches laitières. Nous avons mesuré cette expression chez des **génisses** ne présentant pas de problèmes de fertilité. En effet, celles-ci étant nullipares et n'ayant jamais allaité, leur fertilité est considérée comme « normale ». Parallèlement, l'expression du système adiponectine a été analysée dans les endomètres de **vaches allaitantes** et de **vaches taries** qualifiées de femelles hypofertiles. Les résultats préliminaires concernent à ce jour peu d'individus et ne permettent pas de mettre en évidence une différence d'expression de ces trois gènes entre les différents groupes. Les expérimentations se poursuivent afin d'identifier la potentielle implication de l'adiponectine sur la qualité endométriale de ces trois groupes d'individus.

L'hypofertilité de la vache Holstein est devenue au cours de ces dernières années un problème majeur au sein des élevages, à l'origine d'un allongement de l'intervalle entre différents vêlages. Cependant, la production laitière est dépendante de la naissance périodique d'un veau. La compréhension des mécanismes à l'origine des pertes embryonnaires, constitue donc un **enjeu agronomique de premier plan**. Nos travaux devraient donc permettre d'identifier si l'adiponectine constitue un marqueur de bonne qualité endométriale et de fertilité chez la race Holstein.

# 4. L'adiponectine : un biomarqueur des échecs répétés d'implantation ?

La prise en charge de femmes souffrant d'échecs répétés d'implantation est aujourd'hui très compliquée. En effet, dans la majorité des cas, la cause de ces échecs est idiopathique. Cependant, plusieurs études ont décrit que les femmes souffrant d'échecs d'implantation à répétition présentent une dérégulation de l'expression de protéines impliquées dans la phase de réceptivité utérine, telles que le récepteur CD55, la mucine-16 ou encore l'apolipoprotéine A-I (Brosens *et al.*, 2010; Bhagwat *et al.*, 2013).

En collaboration avec le CHI de Poissy-Saint-Germain-en-Laye, notre laboratoire a déjà pu étudier le profil d'expression de l'adiponectine et de ses deux récepteurs spécifiques, ADIPOR1 et ADIPOR2, dans l'endomètre de femmes fertiles et des femmes souffrant d'échecs répétés d'implantation. Il a été mis en évidence que l'expression des récepteurs transmembranaires, ADIPOR1 et ADIPOR2, est diminuée dans les endomètres de femmes souffrant de cette pathologie (Dos Santos *et al.*, 2012). Ainsi, il peut être supposé que le signal adiponectine constitue un facteur régulateur important dans la mise en place de la réceptivité utérine à l'embryon. Dans ce contexte, nous souhaitons compléter ce travail en mesurant les taux d'adiponectine circulants chez des patientes normo-pondérées souffrant d'échecs répétés d'implantation. Ces résultats seront comparés chez un groupe de patientes contrôles constitué de donneuses d'ovocytes fertiles ne présentant aucune complication au cours de leur(s) grossesse(s) antérieure(s).

Les prélèvements sanguins seront réalisés lors de la fenêtre implantatoire, correspondant à la phase de réceptivité utérine à l'embryon. L'adiponectinémie sera mesurée par un test ELISA. Parallèlement, certains polymorphismes du gène de l'adiponectine, impliqués dans certaines pathologies de la grossesse, seront analysés par RT-qPCR allèle spécifique, comme décrit dans l'article 2.

Par cette approche intégrée (*in vivo* et *in vitro*) et en utilisant les modèles humain et bovin, ces travaux devraient permettre de déterminer si l'adiponectine peut constituer un biomarqueur des échecs répétés d'implantation et ainsi améliorer la prise en charge des femmes infertiles.

# C. L'adiponectine : un régulateur de la croissance fœtale

Trois études réalisées chez l'Homme, la souris et le rat, suggèrent que l'adiponectine exerce un rôle inhibiteur sur la croissance fœtale (Caminos *et al.*, 2005; Rosario *et al.*, 2012; Aye *et al.*, 2013). La croissance fœtale est un processus qui dépend (i) de la **régulation de la balance prolifération/apoptose** contrôlant directement la surface placentaire et (ii) de l'activité des **transporteurs de nutriments** dans le placenta (Évain-Brion, 2012). Récemment, l'EA-7404 a également démontré que la **fonction mitochondriale** est dérégulée dans les placentas pathologiques issus de nourrissons souffrant de retard de croissance intra-utérin. Plus précisément, il a été décrit que le nombre de mitochondries placentaires est positivement corrélé au poids du nourrisson à la naissance. De plus, le laboratoire a montré que l'expression de gènes clés de la biogenèse mitochondriale (ERRγ, SIRT1, PGC1- $\alpha$ ) est diminuée dans le placenta au cours de retards de croissance (Poidatz *et al.*, 2015).

Dans ce contexte, nous avons étudié ces paramètres dans le placenta humain de premier trimestre de grossesse. Nous avons tout d'abord observé que l'adiponectine diminue l'expression des **transporteurs de glucose** (GLUT1 et GLUT12) et des **acides aminés** (SNAT1, SNAT2 et SNAT4) dans les cellules trophoblastiques villeuses. Ces effets sont associés à une diminution du **stock de mitochondries actives** et de la **biogenèse mitochondriale** dans ce type cellulaire en présence d'adiponectine. Enfin, l'adiponectine induit un **signal pro-apoptotique** *via* l'expression des gènes *TP53* et *BAX*.

Ainsi, nous avons observé que l'adiponectine exerce un « effet atypique » dans le placenta humain. En effet, dans les cellules musculaires qui constituent des cellules cibles privilégiées de l'adiponectine, celle-ci favorise la consommation de glucose et la biogenèse mitochondriale (Mao *et al.*, 2006; Iwabu *et al.*, 2010). Cependant, ces résultats sont en accord avec les données de la littérature, où il est décrit que l'adiponectine réduit le transport des acides aminés dans le placenta humain de troisième trimestre (Jones *et al.*, 2010). En revanche, elle exerce son rôle classique d'hormone pro-apoptotique décrit dans de nombreux types cellulaires (Brakenhielm *et al.*, 2004; Dieudonne *et al.*, 2006; Konishi *et al.*, 2011). L'ensemble de ces mécanismes pourrait ainsi être à l'origine de la régulation de la croissance fœtale par l'adiponectine. Afin de confirmer **le rôle inhibiteur de l'adiponectine maternelle sur la croissance du fœtus**, plusieurs travaux sont actuellement en cours au sein de l'équipe.

# 1. Rôles de l'adiponectine au cours de la nutrition histiotrophe

Au cours de cette thèse, nous avons observé que l'adiponectine favorise l'accumulation et la sécrétion de glycogène par les cellules endométriales, créant ainsi un environnement bénéfique au développement de l'embryon au cours des premiers stades de la grossesse. Ces résultats sont très intéressants et pourraient contribuer à expliquer l'importance de l'adiponectine dans la physiopathologie de l'infertilité humaine, observée notamment lors d'échecs répétés d'implantation. En effet, cette pathologie se caractérise par (i) un défaut d'expression des récepteurs de l'adiponectine ADIPOR1 et ADIPOR2 dans l'endomètre (Dos Santos *et al.*, 2012) et (ii) une faible accumulation de glycogène endométrial (Maeyama *et al.*, 1977). Nous pouvons donc supposer qu'un faible signal adiponectine dans l'endomètre humain, participe à l'établissement de cette infertilité *via* la réduction de la quantité de glycogène endométrial.

Parallèlement, nous avons observé que l'adiponectine freine l'entrée du glycogène dans les cellules trophoblastiques villeuses. Il semblerait donc que le contrôle de l'apport nutritif au fœtus par l'adiponectine soit un phénomène très précoce au cours de la grossesse qui a lieu bien avant l'arrivée du sang maternel dans la chambre intervilleuse à la fin du premier trimestre. Notre étude a également permis de démontrer que les cellules trophoblastiques villeuses absorbent le glycogène endométrial par endocytose. Le glycogène endocyté est ensuite dirigé vers les lysosomes afin d'y être dégradé en molécules de glucose. Ce processus est appelé **glycophagie**.

Nous souhaitons à présent compléter ces premières informations en étudiant l'implication directe de l'adiponectine au cours de la glycophagie placentaire. Nous étudierons les effets de l'adiponectine sur le transport vésiculaire du glycogène dans le placenta, par une approche d'immunocytochimie. Pour cela, nous mesurerons l'expression des protéines EEA-1 et LAMP-1 dans les cellules trophoblastiques en présence ou non d'adiponectine. Ces deux protéines sont utilisées comme marqueurs des endosomes et des lysosomes, respectivement.

Certaines pathologies appelées **glycogénoses**, telles que la maladie de Pompe, se caractérisent par un défaut de dégradation du glycogène par la voie lysosomale. L'accumulation excessive de glycogène devient alors toxique pour les cellules, engendrant des troubles musculaires, cardiaques, respiratoires et

• 218 •

moteurs (van der Ploeg and Reuser, 2008). Une étude réalisée *in vitro* a démontré que la stimulation de l'exocytose dans des fibroblastes issus de patients souffrant de la maladie de Pompe pourrait constituer une piste thérapeutique majeure (Turner *et al.*, 2015). Dans ce contexte, nous pourrions envisager cette stratégie chez des femmes infertiles, pour faciliter le trafic vésiculaire du glycogène de l'endomètre vers le placenta et ainsi améliorer l'implantation embryonnaire.

## 2. Rôles de l'adiponectine au cours de la nutrition hémotrophe

L'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la mise en place et le déroulement de la grossesse humaine se heurte à de nombreux obstacles d'ordre pratique et éthique. Chez l'Homme, les données sont donc généralement issues d'études *in vitro*. Malgré l'importance de ces dernières dans la compréhension de nombreux mécanismes, celles-ci sont cependant très éloignées des conditions physiologiques observées *in vivo*. Ainsi, le lien direct entre l'adiponectine et la croissance fœtale n'a pu véritablement être démontré qu'au sein d'un modèle animal. En effet, l'injection d'adiponectine au cours de la gestation chez la souris induit une réduction du poids des souriceaux accompagnée d'une baisse d'expression des transporteurs des acides aminés dans le placenta (Rosario *et al.*, 2012). C'est pourquoi notre équipe a développé récemment un modèle de **perfusion placentaire** permettant de recréer en laboratoire la circulation fœto-maternelle humaine (**Figure 51**). A l'aide de ce modèle proche de la physiologie, nous souhaitons étudier l'effet de l'adiponectine maternelle sur le passage transplacentaire de molécules telles que le glucose ou les acides aminés. Ceux-ci seront directement dosés dans le compartiment fœtal (Ceccaldi *et al.*, 2010). Les expérimentations sont actuellement en cours.



Figure 51. Modèle de perfusion placentaire.

Modifié d'après Ceccaldi *et al.* 2010. (A) La solution d'intérêt (par exemple, une solution de glucose) est placée dans le compartiment maternel. Cette solution est amenée par une pompe à un fragment de placenta (cotylédon) (B). Les solutions recueillies dans le compartiment fœtal sont ensuite analysées afin d'étudier le passage transplacentaire de la molécule d'intérêt, ici le glucose (C).

Ces deux approches *in vitro* et *ex vivo* devraient permettre de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle négatif de l'adiponectine sur la croissance fœtale, au cours du premier trimestre (nutrition histiotrophe) et du troisième trimestre (nutrition hémotrophe). **Ainsi, nous pourrons envisager d'utiliser l'adiponectine maternelle comme un biomarqueur de pathologies de la croissance fœtale, telles que la macrosomie et le retard de croissance** *in utero***.** 

# 3. L'adiponectine : un biomarqueur des pathologies de la croissance fœtale ?

Plusieurs études ont tenté d'établir un lien entre les taux d'adiponectine circulants chez la mère et le **retard de croissance** *in utero* (RCIU). Cependant, à l'heure actuelle, les données restent controversées et aucun consensus n'est à ce jour admis (Evagelidou *et al.*, 2007; Kyriakakou *et al.*, 2008; Büke *et al.*, 2014; Visentin *et al.*, 2014). En revanche, aucune équipe ne s'est intéressé au lien entre l'adiponectinémie maternelle et le risque de **macrosomie**.

Dans ce contexte, en collaboration avec le CHI de Poissy-Saint-Germain-en-Laye, nous souhaitons étudier trois populations de patientes normo-pondérées. Une population « Contrôle », une population « RCIU » et une population « Macrosomie ». Un dosage de l'adiponectinémie maternelle sera réalisé avant le début du travail, sur des césariennes programmées. Parallèlement une analyse génétique des polymorphismes de l'adiponectine sera également effectuée, comme décrit dans l'article 2.

Les placentas seront également récupérés et une étude comparative de l'expression des récepteurs de l'adiponectine (ADIPOR1 et ADIPOR2) entre les trois populations sera réalisée. L'expression des transporteurs de glucose (GLUT) et d'acides aminés (SNAT) pourra également être mesurée. Enfin, des expérimentations de perfusion placentaire pourront être envisagées. Celles-ci permettront de comparer le passage transplacentaire de différentes molécules nutritives dans des placentas sains (groupe « Contrôle ») et des placentas pathologiques (groupe « RCIU » et groupe « Macrosomie »). Ainsi, ces travaux devraient permettre de déterminer si l'adiponectine maternelle peut constituer un biomarqueur de pathologies de la croissance fœtale (macrosomie ou RCIU).

# D. Obésité maternelle et croissance fœtale

L'ensemble de ces travaux de thèse a permis de compléter des données précédentes de la littérature, concernant le rôle de l'adiponectine à l'interface fœto-maternelle humaine (Lappas *et al.*, 2005; Takemura *et al.*, 2006; Benaitreau *et al.*, 2010a, 2010b). Nous avons observé que l'adiponectine exerce une **action opposée** sur de nombreux processus physiologiques dans l'endomètre et le placenta au cours de la grossesse (**Figure 52**). Un **déséquilibre du signal adiponectine** pourrait donc vraisemblablement être à l'origine de diverses pathologies de la grossesse. L'obésité constitue un excellent modèle de dérégulation des taux d'adiponectine circulants.



Figure 52. Effets antagonistes de l'adiponectine à l'interface fœto-maternelle humaine.

Aujourd'hui, l'**obésité** constitue un véritable problème de santé publique. En effet, la population mondiale compte plus d'un milliard d'individus en surpoids dont 310 millions d'obèses (Dağ and Dilbaz, 2015). L'obésité peut être impliquée dans la survenue de **désordres de la fonction de reproduction**, en dérégulant la physiologie de nombreux organes (hypothalamus, hypophyse, ovaire, endomètre, placenta). Ces dysfonctions associées à l'obésité sont responsables d'une hypofertilité de l'obèse caractérisée notamment par une réduction des chances de grossesse spontanée (van der Steeg *et al.*, 2007; Wise *et al.*, 2010; Dağ and Dilbaz, 2015).

Au cours de la grossesse, l'obésité maternelle est également impliquée dans la survenue d'anomalies du développement et du métabolisme fœtaux. Plus précisément, le risque de **macrosomie fœtale** est très élevé chez les mères obèses, comparativement aux femmes normo-pondérées (14% *vs.* 8%) (Leddy *et al.*, 2008). De manière plus surprenante, l'obésité maternelle est également un facteur favorisant la survenue de retard de croissance *in utero* (Radulescu *et al.*, 2013; Segovia *et al.*, 2014).

L'obésité est associée à une accumulation anormale de masse grasse dans l'organisme. Elle s'accompagne notamment d'une dérégulation de la production des facteurs adipocytaires. Contrairement aux adipokines telles que la leptine, la résistine, la chémérine ou la visfatine, dont la production augmente proportionnellement à la masse grasse, la sécrétion d'adiponectine est diminuée chez les

• 222 •

individus obèses (Hu *et al.*, 1996). Le ratio leptine/adiponectine est donc fortement augmenté dans le contexte de l'obésité. Aujourd'hui, l'utilisation du **ratio leptine/adiponectine** est considéré comme un biomarqueur efficace du diagnostic de pathologies associées à l'obésité, tels que le syndrome métabolique, l'insulino-résistance, l'athérosclérose et les cancers hormono-dépendants (Satoh *et al.*, 2004; Finucane *et al.*, 2009; Zhuo *et al.*, 2009). L'utilisation de ce ratio dans le contexte des pathologies de la reproduction pourrait donc être envisagée. Celui-ci est d'ailleurs augmenté lors de la survenue du syndrome des ovaires polykystiques (Chen *et al.*, 2015).

En collaboration avec le CHI de Poissy-Saint-Germain-en-Laye, deux populations de femmes obèses sont actuellement en cours de recrutement. Le premier groupe sera composé de femmes obèses qui ont donné naissance à un nourrisson macrosome. Le second groupe sera formé de femmes obèses dont le fœtus souffre de RCIU. Nous souhaitons réaliser un dosage des taux de leptine et d'adiponectine circulants chez la mère au sein de ces deux populations afin de mettre en évidence une éventuelle corrélation entre le ratio leptine/adiponectine et la croissance fœtale dans un contexte d'obésité maternelle. A terme, nous souhaitons déterminer comment ce désordre métabolique chez la mère est associé à deux pathologies fœtales opposées : la macrosomie et le RCIU. **Ainsi, ce travail permettra de mettre en évidence le rôle de la leptine et de l'adiponectine dans l'impact négatif de l'obésité maternelle sur la grossesse humaine.** 

# E. Conclusion

En conclusion, ces résultats de thèse ont démontré que l'adiponectine est fortement impliquée dans la **préparation de l'endomètre** à accueillir un embryon. Elle agit également sur l'**invasion trophoblastique** par un double contrôle dans les cellules placentaires et dans les cellules endométriales. Enfin, l'adiponectine constitue véritablement un régulateur clé de l'**apport nutritif au fœtus** dès les premières étapes de la grossesse. Ce rôle perdure tout au long du premier trimestre de grossesse, contribuant ainsi à contrôler la **croissance fœtale**. L'**adiponectine semble donc être un acteur majeur du dialogue fœto-maternel impliqué dans le bon déroulement de la gestation précoce.** 

# RÉFÉRENCES

Abd-Alaleem DI, Attiaa KI, Khalefa AA, Ahmad RA. Adiponectin levels in serum of women with preeclampsia. *Eastern Mediterranean Health Journal*. 2011; 17:575–581.

Achache H, Tsafrir A, Prus D, Reich R, Revel A. Defective endometrial prostaglandin synthesis identified in patients with repeated implantation failure undergoing in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*. 2010; 94:1271–1278.

Adachi M, Brenner DA. High molecular weight adiponectin inhibits proliferation of hepatic stellate cells via activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase. <u>*Hepatology*</u> 2008; 47:677–685.

Adamczak M, Wiecek A, Funahashi T, Chudek J, Kokot F, Matsuzawa Y. Decreased plasma adiponectin concentration in patients with essential hypertension. *American Journal of Hypertension*. 2003; 16:72–75.

Adams Waldorf KM, McAdams RM. Influence of infection during pregnancy on fetal development. <u>*Reproduction*</u>. 2013; 146:R151-62.

**Aghajanova** L, Tatsumi K, Horcajadas JA, Zamah AM, Esteban FJ, Herndon CN, Conti M, Giudice LC. Unique Transcriptome, Pathways, and Networks in the Human Endometrial Fibroblast Response to Progesterone in Endometriosis. *Biology of Reproduction.* 2011; 84:801–815.

Ailhaud G. L'adipocyte, cellule sécrétrice et endocrine. Médecine/Sciences. 1998; 14:858-864.

**Ajuwon** KM, Spurlock ME. Adiponectin inhibits LPS-induced NF- B activation and IL-6 production and increases PPAR-2 expression in adipocytes. <u>*American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology,* 2005; 288:R1220–R1225.</u>

Al-Suhaimi EA, Shehzad A. Leptin, resistin and visfatin: the missing link between endocrine metabolic disorders and immunity. *European Journal of Medical Research*. 2013; 18:12.

Ali CR, Fitzgerald C. Omental and peritoneal secondary trophoblastic implantation - an unusual complication after IVF. *Reproductive Biomedicine Online.* 2006; 12:776–778.

**Allison** MB, Myers MG. 20 years of leptin: connecting leptin signaling to biological function. *Journal of Endocrinology*. 2014; 223:T25-35.

Anin SA, Vince G, Quenby S. Trophoblast invasion. *Human Fertility*. 2004; 7:169–174.

Aplin JD, Kimber SJ. Trophoblast-uterine interactions at implantation. <u>Reproductive Biology and Endocrinology</u>. 2004; 2:48.

Aplin JD, Ruane PT. Embryo–epithelium interactions during implantation at a glance. *Journal of Cell Science*. 2017; 130:15–22.

Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, et al. Paradoxical Decrease of an Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Obesity. <u>Biochemical and Biophysical Research</u> <u>Communications</u>. 1999a; 257:79–83.

Asano T, Watanabe K, Kubota N, Gunji T, Omata M, Kadowaki T, Ohnishi S. Adiponectin knockout mice on high fat diet develop fibrosing steatohepatitis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2009; 24:1669–1676.

Asmakh M Al. Reproductive functions of progesterone. Middle East Fertility Society Journal. 2007; 12:147-152.

Atègbo J-M, Grissa O, Yessoufou A, Hichami A, Dramane KL, Moutairou K, Miled A, Grissa A, Jerbi M, Tabka Z, et al. Modulation of adipokines and cytokines in gestationAtègbo J-M, Grissa O, Yessoufou A, Hichami A, Dramane KL, Moutairou K, Miled A, Grissa A, Jerbi M, Tabka Z, Khan NA. Modulation of adipokines and cytokines in gestational diabetes and macrosomia. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2006; 91:4137–4143.

Aye ILMH, Gao X, Weintraub ST, Jansson T, Powell TL. Adiponectin inhibits insulin function in primary trophoblasts by PPAR $\alpha$ -mediated ceramide synthesis. *Molecular Endocrinology*. 2014; 28:512–524.

Aye ILMH, Powell TL, Jansson T. Review: Adiponectin--the missing link between maternal adiposity, placental transport and fetal growth? *Placenta*. 2013; 34 Suppl:S40-5.

**Bacci** S, Menzaghi C, Ercolino T, Ma X, Rauseo A, Salvemini L, Vigna C, Fanelli R, Mario U Di, Doria A, et al. The +276 G/T single nucleotide polymorphism of the adiponectin gene is associated with coronary artery disease in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2004; 27:2015–2020.

**Bagga** R, Vasishta K, Majumdar S, Garg SK. Correlation between human placental lactogen levels and glucose metabolism in pregnant women with intrauterine growth retardation. <u>*Australian and New-Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology.*</u> 1990; 30:310–313.

Bai Y, Sun Q. Macrophage recruitment in obese adipose tissue. *Obesity Reviews.* 2015; 16:127–136.

**Ball** E, Bulmer JN, Ayis S, Lyall F, Robson SC. Late sporadic miscarriage is associated with abnormalities in spiral artery transformation and trophoblast invasion. *Journal of Pathology.* 2006; 208:535–542.

**Barnea** G, Strapps W, Herrada G, Berman Y, Ong J, Kloss B, Axel R, Lee KJ. The genetic design of signaling cascades to record receptor activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2008; 105:64–69.

**Barseghian** A, Gawande D, Bajaj M. Adiponectin and Vulnerable Atherosclerotic Plaques. *Journal of the American College* of *Cardiology*. 2011; 57:761–770.

**Basen-Engquist** K, Chang M. Obesity and cancer risk: recent review and evidence. <u>*Current Oncology Reports.*</u> 2011; 13:71–76.

**Basirat** Z, Barat S, Hajiahmadi M. Serum beta human chorionic gonadotropin levels and preeclampsia. *Saudi Medical Journal*. 2006; 27:1001–1004.

**Basu** R, Pajvani UB, Rizza RA, Scherer PE. Selective Downregulation of the High–Molecular Weight Form of Adiponectin in Hyperinsulinemia and in Type 2 Diabetes. <u>*Diabetes*</u>. 2007; 56:2174–2177.

**Bauche** IB, Ait El Mkadem S, Rezsohazy R, Funahashi T, Maeda N, Miranda LM, Brichard SM. Adiponectin downregulates its own production and the expression of its AdipoR2 receptor in transgenic mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006; 345:1414–1424.

**Bauer** S, Pollheimer J, Hartmann J, Husslein P, Aplin JD, Knöfler M. Tumor Necrosis Factor-α Inhibits Trophoblast Migration through Elevation of Plasminogen Activator Inhibitor-1 in First-Trimester Villous Explant Cultures. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2004; 89:812–822.

**Belfort** MA, Sarode R, McIntire DD, Burner JD, Leveno KJ, Holt M. Placenta accreta. *American Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2010; 203:430–439.

**Belkacemi** L, Kjos S, Nelson DM, Desai M, Ross MG. Reduced apoptosis in term placentas from gestational diabetic pregnancies. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*. 2013; 4:256–265.

**Benaitreau** D, Dieudonné M-N, Santos E Dos, Leneveu M-C, Mazancourt P de, Pecquery R. Antiproliferative effects of adiponectin on human trophoblastic cell lines JEG-3 and BeWo. *Biology of Reproduction*. 2009; 80:1107–1114.

**Benaitreau** D, Santos E Dos, Leneveu M-C, Alfaidy N, Feige J-J, Mazancourt P de, Pecquery R, Dieudonné M-N. Effects of adiponectin on human trophoblast invasion. *Journal of Endocrinology*. 2010a; 207:45–53.

**Benaitreau** D, Santos E Dos, Leneveu M-C, Mazancourt P De, Pecquery R, Dieudonné M-N. Adiponectin promotes syncytialisation of BeWo cell line and primary trophoblast cells. *<u>Reproductive Biology and Endocrinology</u>*. 2010b; 8:128.

Benirschke K, Burton G, Graham J, Baergen RN. Pathology of the human placenta. 2012; Springer.

Benirschke K, Kaufmann P. Pathology of the human placenta. 1990; Springer.

**Berendsen** AD, Olsen BR. How vascular endothelial growth factor-A (VEGF) regulates differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2014; 62:103–108.

**Bernardini** LM, Civile O, Gianaroli L, Me SISR. Signal transduction of hCG induces decidualization and uterine receptivity. *Journal of Fertility Biomarkers*. 2015; 1:1–19.

**Bersinger** NA, Wunder DM. Adiponectin isoform distribution in serum and in follicular fluid of women undergoing treatment by ICSI. <u>Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica</u>. 2010; 89:782–788.

**Bersinger** NA, Birkhäuser MH, Wunder DM. Adiponectin as a marker of success in intracytoplasmic sperm injection/embryo transfer cycles. *Gynecological Endocrinology*. 2006; 22:479–483.

**Bhagwat** SR, Chandrashekar DS, Kakar R, Davuluri S, Bajpai AK, Nayak S, Bhutada S, Acharya K, Sachdeva G. Endometrial receptivity: a revisit to functional genomics studies on human endometrium and creation of HGEx-ERdb. <u>*PLoS One.*</u> 2013; 8:e58419.

Bi TQ, Che XM. Nampt/PBEF/visfatin and cancer. Cancer Biology and Therapy. 2010; 10:119-125.

Biason-Lauber A. WNT4, RSPO1, and FOXL2 in Sex Development. Seminars in Reproductive Medicine. 2012; 30:387-395.

**Bilalis** DA, Klentzeris LD, Fleming S. Immunohistochemical localization of extracellular matrix proteins in luteal phase endometrium of fertile and infertile patients. *Human Reproduction*. 1996; 11:2713–2718.

**Biswas** D, Vettriselvi V, Choudhury J, Jothimalar R. Adiponectin gene polymorphism and its association with type 2 diabetes mellitus. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2011; 26:172–177.

**Biswas** S, Ghosh SK, Chhabra S. Surface area of chorionic villi of placentas: An index of intrauterine growth restriction of fetuses. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2008; 34:487–493.

Blackburn ST. Maternal, fetal, & amp; neonatal physiology : a clinical perspective. 2007; Saunders Elsevier.

**Blümer** RME, Roomen CP van, Meijer AJ, Houben-Weerts JHPM, Sauerwein HP, Dubbelhuis PF. Regulation of adiponectin secretion by insulin and amino acids in 3T3-L1 adipocytes. <u>*Metabolism*</u>. 2008; 57:1655–1662.

**Boeke** CE, Mantzoros CS, Hughes MD, L. Rifas-Shiman S, Villamor E, Zera CA, Gillman MW. Differential associations of leptin with adiposity across early childhood. *Obesity*. 2013; 21:1430–1437.

**Bohlouli** S, Khazaei M, Teshfam M, Hassanpour H. Adiponectin effect on the viability of human endometrial stromal cells and mRNA expression of adiponectin receptors. *International Journal of Fertility and Sterility*. 2013; 7:43–48.

**Bourboulia** D, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Seminars in Reproductive Biology*. 2010; 20:161–168.

Bouteiller P Le, Tabiasco J. Immunologie de la grossesse : faits nouveaux. <u>Médecine/Sciences.</u> 2006; 22:745-750.

**Bozaoglu** K, Bolton K, McMillan J, Zimmet P, Jowett J, Collier G, Walder K, Segal D. Chemerin Is a Novel Adipokine Associated with Obesity and Metabolic Syndrome. *Endocrinology*. 2007; 148:4687–4694.

**Brakenhielm** E, Veitonmaki N, Cao R, Kihara S, Matsuzawa Y, Zhivotovsky B, Funahashi T, Cao Y. Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004; 101:2476–2481.

**Brar** AK, Frank GR, Kessler CA, Cedars MI, Handwerger S. Progesterone-dependent decidualization of the human endometrium is mediated by cAMP. *Endocrine Journal*. 1997; 6:301–307.

**Brar** AK, Frank GR, Richards RG, Meyer AJ, Kessler CA, Cedars MI, Klein DJ, Handwerger S. Laminin decreases PRL and IGFBP-1 expression during in vitro decidualization of human endometrial stromal cells. *Journal of Cell Physiology*. 1995; 163:30–37.

**Brawand** D, Wahli W, Kaessmann H. Loss of Egg Yolk Genes in Mammals and the Origin of Lactation and Placentation. In Phillippe H, editor. *PLoS Biology.* 2008; 6:e63.

**Breidert** M, Miehlke S, Glasow A, Orban Z, Stolte M, Ehninger G, Bayerdörffer E, Nettesheim O, Halm U, Haidan A, et al. Leptin and its receptor in normal human gastric mucosa and in Helicobacter pylori-associated gastritis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 1999; 34:954–961.

**Brett** KE, Ferraro ZM, Yockell-Lelievre J, Gruslin A, Adamo KB. Maternal-fetal nutrient transport in pregnancy pathologies: the role of the placenta. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014; 15:16153–16185.

**Brew** K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010; 1803:55–71.

**Bromer** JG, Aldad TS, Taylor HS. Defining the proliferative phase endometrial defect. *Fertility and Sterility*. 2009; 91:698–704.

**Brosens** JJ, Hayashi N, White JO. Progesterone receptor regulates decidual prolactin expression in differentiating human endometrial stromal cells. *Endocrinology*. 1999; 140:4809–4820.

**Brosens** JJ, Hodgetts A, Feroze-Zaidi F, Sherwin JRA, Fusi L, Salker MS, Higham J, Rose GL, Kajihara T, Young SL, et al. Proteomic analysis of endometrium from fertile and infertile patients suggests a role for apolipoprotein A-I in embryo implantation failure and endometriosis. *Molecular Human Reproduction*. 2010; 16:273–285.

• 226 •

Bry H, Young J. quels impacts de l'obésité sur l'axe gonadotrope et la fertilité ? Endocrinologie et Diabète. 2012; 25-29.

**Buchanan** GD. Reproduction in the ferret (Mustela furo). II. Changes following ovariectomy during early pregnancy. *Journal* of *Reproduction and Fertility*. 1969; 18:305–316.

**Büke** B, Topçu HO, Engin-Üstün Y, Danışman N. Comparison of serum maternal adiponectin concentrations in women with isolated intrauterine growth retardation and intrauterine growth retardation concomitant with pre-eclampsia. *Journal of the Turkish-German Gynecological Association*. 2014; 15:173–176.

Bulletti C, Coccia ME, Battistoni S, Borini A. Endometriosis and infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2010; 27:441–447.

**Bulun** SE, Cheng Y-H, Yin P, Imir G, Utsunomiya H, Attar E, Innes J, Julie Kim J. Progesterone resistance in endometriosis: Link to failure to metabolize estradiol. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2006; 248:94–103.

**Burke** KA, Jauniaux E, Burton GJ, Cindrova-Davies T. Expression and immunolocalisation of the endocytic receptors megalin and cubilin in the human yolk sac and placenta across gestation. *Placenta*. 2013; 11:1105-1109.

**Burrows** TD, King A, Loke YW. Trophoblast migration during human placental implantation. <u>*Human Reproduction Update.*</u> 1996; 2:307–321.

Burton GJ, Fowden AL. The placenta: a multifaceted, transient organ. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 2015; 370.

**Burton** GJ, Hempstock J, Jauniaux E. Nutrition, Genetics and Placental Development. Nutrition of the Human Fetus during the First Trimester--A Review. *Placenta*. 2001; 22:70–76.

Burton GJ, Jauniaux E, Charnock-Jones DS. Human Early Placental Development: Potential Roles of the Endometrial Glands. *Placenta*. 2007; s64-69.

**Burto**n GJ, Scioscia M, Rademacher TW. Endometrial secretions: creating a stimulatory microenvironment within the human early placenta and implications for the aetiopathogenesis of preeclampsia. *Journal of Reproductive Immunology*. 2011; 89:118–125.

**Burton** GJ, Watson AL, Hempstock J, Skepper JN, Jauniaux E. Uterine Glands Provide Histiotrophic Nutrition for the Human Fetus during the First Trimester of Pregnancy. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2002; 87:2954–2959.

**Caminos** JE, Nogueiras R, Gallego R, Bravo S, Tovar S, García-Caballero T, Casanueva FF, Diéguez C. Expression and regulation of adiponectin and receptor in human and rat placenta. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2005; 90:4276–4286.

Canel M, Serrels A, Frame MC, Brunton VG. E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. *Journal of Cell Science*. 2013; 126:393–401.

Caprio M. Leptine et reproduction. Métabolismes Hormones Diabètes et Nutrition. 2004; 5-179-188.

Caron É, Steculorum S, Ishii Y. Leptine et contrôle hypothalamique de la reproduction. <u>Médecine de la Reproduction</u>, <u>Gynécologie Endocrinologie</u>. 2008; 10:74–84.

Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazleabas AT, Lessey BA, Yoshinaga K. Embryo Implantation. *Developmental Biology*. 2000; 223:217–237.

**Casarini** L, Lispi M, Longobardi S, Milosa F, Marca A La, Tagliasacchi D, Pignatti E, Simoni M. LH and hCG action on the same receptor results in quantitatively and qualitatively different intracellular signalling. *PLoS One*. 2012; 7:e46682.

Cassis LA, Saye J, Peach MJ. Location and regulation of rat angiotensinogen messenger RNA. <u>*Hypertension*</u>. 1988; 11:591–596.

**Castellucci** M, Matteis R De, Meisser A, Cancello R, Monsurrò V, Islami D, Sarzani R, Marzioni D, Cinti S, Bischof P. Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases: possible implications for trophoblast invasion. <u>Molecular Human Reproduction</u>. 2000; 6:951–958.

**Ceccaldi** P-F, Mandelbrot L, Farinotti R, Forestier F, Gil S. Apports de la perfusion ex vivo du cotylédon humain dans l'étude du passage placentaire des médicaments. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction.* 2010; 39:601–605.

**Ceddia** RB, Somwar R, Maida A, Fang X, Bikopoulos G, Sweeney G. Globular adiponectin increases GLUT4 translocation and glucose uptake but reduces glycogen synthesis in rat skeletal muscle cells. *Diabetologia*. 2005; 48:132–139.

**Chabrolle** C, Tosca L, Crochet S, Tesseraud S, Dupont J. Expression of adiponectin and its receptors (AdipoR1 and AdipoR2) in chicken ovary: potential role in ovarian steroidogenesis. *Domestic Animal Endocrinology*. 2007a; 33:480–487.

**Chabrolle** C, Tosca L, Dupont J. Regulation of adiponectin and its receptors in rat ovary by human chorionic gonadotrophin treatment and potential involvement of adiponectin in granulosa cell steroidogenesis. *<u>Reproduction</u>*. 2007b; 133:719–731.

Chabrolle C, Tosca L, Ramé C, Lecomte P, Royère D, Dupont J. Adiponectin increases insulin-like growth factor I-induced progesterone and estradiol secretion in human granulosa cells. *Fertility and Sterility*. 2009; 92:1988–1996.

Challier J-C, Uzan S. Le placenta humain et ses pathologies: l'oxygène en question. <u>Médecine/Sciences.</u> 2003; 19:1111–1120.

**Chang** E, Choi J, Kim W, Rhee E-J, Oh K, Lee W-Y, Park S, Park S, Park C-Y. Restoration of adiponectin expression via the ERK pathway in TNFα-treated 3T3-L1 adipocytes. *Molecular Medicine Reports*. 2014; 10:905–910.

Chappaz E, Albornoz MS, Campos D, Che L, Palin M-F, Murphy BD, Bordignon V. Adiponectin enhances in vitro development of swine embryos. *Domestic Animal Endocrinology*. 2008; 35:198–207.

Chartrel N, Vaudry H. La relaxine: une ancienne hormone trouve enfin ses récepteurs. <u>Médecine/Sciences.</u> 2002; 6:670-672.

**Chehab** FF, Lim ME, Lu R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nature Genetics.* 1996; 12:318–320.

Chen B, Lam KSL, Wang Y, Wu D, Lam MC, Shen J, Wong L, Hoo RLC, Zhang J, Xu A. Hypoxia dysregulates the production of adiponectin and plasminogen activator inhibitor-1 independent of reactive oxygen species in adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006; 341:549–556.

Chen C-I, Hsu M-I, Lin S-H, Chang Y-CI, Hsu C-S, Tzeng C-R. Adiponectin and leptin in overweight/obese and lean women with polycystic ovary syndrome. *Gynecological Endocrinology*. 2015; 31:264–268.

Chen C-Y, Wang K-G, Chen C-P. Alteration of vascularization in preeclamptic placentas measured by three-dimensional power Doppler ultrasound. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*. 2013; 26:1616–1622.

Chen H, Chen H, Wu Y, Liu B, Li Z, Wang Z. Adiponectin exerts antiproliferative effect on human placenta via modulation of the JNK/c-Jun pathway. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2014; 7:2894–2904.

Chen J, Spagnoli A, Torquati A. Omental Gene Expression of Adiponectin Correlates with Degree of Insulin Sensitivity Before and After Gastric Bypass Surgery. <u>Obesity Surgery</u>. 2012; 22:472–477.

Chen TJ, Jow GM. Effects of estrogen on progesterone receptor synthesis during endometrial cell culture. *Journal of the Formosan Medical Association*. 1989; 88:456–461.

**Chen** Y-J, Zhang L-Q, Wang G-P, Zeng H, Lü B, Shen X-L, Jiang Z-P, Chen F-P. Adiponectin inhibits tissue factor expression and enhances tissue factor pathway inhibitor expression in human endothelial cells. *Thrombosis and Haemostasis.* 2008;100:291–300.

**Cheng** L, Shi H, Jin Y, Li X, Pan J, Lai Y, Lin Y, Jin Y, Roy G, Zhao A, et al. Adiponectin Deficiency Leads to Female Subfertility and Ovarian Dysfunctions in Mice. *Endocrinology*. 2016; 157:4875–4887.

**Cheng** X-B, Wen J-P, Yang J, Yang Y, Ning G, Li X-Y. GnRH secretion is inhibited by adiponectin through activation of AMP-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase. *Endocrine Journal.* 2011; 39:6–12.

**Chevillotte** E, Giralt M, Miroux B, Ricquier D, Villarroya F. Uncoupling Protein-2 Controls Adiponectin Gene Expression in Adipose Tissue Through the Modulation of Reactive Oxygen Species Production. <u>*Diabetes*</u>. 2007; 56:1042–1050.

Choi K-H, Joo B-S, Sun S-T, Park M-J, Son J-B, Joo J-K, Lee K-S. Administration of visfatin during superovulation improves developmental competency of oocytes and fertility potential in aged female mice. *Fertility and Sterility*. 2012; 97:1234–1241.e3.

**Chou** C-S, Zhu H, MacCalman CD, Leung PCK. Regulatory Effects of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) I and GnRH II on the Levels of Matrix Metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9, and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 in Primary Cultures of Human Extravillous Cytotrophoblasts. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2003; 88:4781–4790.

**Chou** C-S, Zhu H, Shalev E, MacCalman CD, Leung PCK. The Effects of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) I and GnRH II on the Urokinase-Type Plasminogen Activator/Plasminogen Activator Inhibitor System in Human Extravillous Cytotrophoblasts in Vitro. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2002; 87:5594–5603.

**Chowdhury** NU, Farooq T, Abdullah S, Mahadi AS, Hasan MM, Zaman Paran T, Hasan N, Mohib MM, Abu M, Sagor T, et al. Matrix Metalloproteinases (MMP), a Major Responsible Downstream Signaling Molecule for Cellular Damage -A Review. *Molecular Enzymology and Drug Targets.* 2016; 2:1–10.

**Choy** L, Derynck R. Transforming Growth Factor-beta Inhibits Adipocyte Differentiation by Smad3 Interacting with CCAAT/Enhancer-binding Protein (C/EBP) and Repressing C/EBP Transactivation Function. *Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278:9609–9619.

**Cizza** G, Nguyen VT, Eskandari F, Duan Z, Wright EC, Reynolds JC, Ahima RS, Blackman MR. Low 24-hour adiponectin and high nocturnal leptin concentrations in a case-control study of community-dwelling premenopausal women with major depressive disorder: the POWER study. *Journal of Clinical Psychiatry*. 2010; 71:1079–1087.

Cole LA. Biological functions of hCG and hCG-related molecules. <u>Reproductive Biology and Endocrinology</u>. 2010; 8:102.

Collins JW, Finley SL, Merrick D, Ogata ES. Human Placental Lactogen Administration in the Pregnant Rat: Acceleration of Fetal Growth. *Pediatric Research*. 1988; 24:663–667.

**Combs** TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L. Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *Journal of Clinical Investigation*. 2001; 108:1875–1881.

Combs TP, Marliss EB. Adiponectin signaling in the liver. <u>Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders</u>. 2014; 15:137–147.

**Combs** TP, Pajvani UB, Berg AH, Lin Y, Jelicks LA, Laplante M, Nawrocki AR, Rajala MW, Parlow AF, Cheeseboro L, et al. A transgenic mouse with a deletion in the collagenous domain of adiponectin displays elevated circulating adiponectin and improved insulin sensitivity. *Endocrinology*. 2004; 145:367–383.

**Comim** F V., Gutierrez K, Bridi A, Bochi G, Chemeris R, Rigo ML, Dau AMP, Cezar AS, Moresco RN, Gonçalves PBD. Effects of Adiponectin Including Reduction of Androstenedione Secretion and Ovarian Oxidative Stress Parameters In Vivo. *PLoS One.* 2016; 11:e0154453.

**Contreras** GA, Strieder-Barboza C, Raphael W. Adipose tissue lipolysis and remodeling during the transition period of dairy cows. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 2017; 8:41.

**Contreras** GA, Thelen K, Schmidt SE, Strieder-Barboza C, Preseault CL, Raphael W, Kiupel M, Caron J, Lock AL. Adipose tissue remodeling in late-lactation dairy cows during feed-restriction-induced negative energy balance. *Journal of Dairy Science*. 2016; 99:10009–10021.

**Coughlan** C, Ledger W, Wang Q, Liu F, Demirol A, Gurgan T, Cutting R, Ong K, Sallam H, Li TC. Recurrent implantation failure: definition and management. *<u>Reproductive BioMedicine Online</u>*. 2014; 28:14–38.

**Cowans** NJ, Spencer K. First-trimester ADAM12 and PAPP-A as markers for intrauterine fetal growth restriction through their roles in the insulin-like growth factor system. *Prenatal Diagnosis*. 2007; 27:264–271.

**D'Ippolito** S, Tersigni C, Scambia G, Simone N Di. Adipokines, an adipose tissue and placental product with biological functions during pregnancy. *Biofactors*. 2012; 38:14–23.

**Dağ** ZÖ, Dilbaz B. Impact of obesity on infertility in women. *Journal of the Turkish-German Gynecological Association*. 2015; 16:111–117.

**Dalamaga** M, Srinivas SK, Elovitz MA, Chamberland J, Mantzoros CS. Serum adiponectin and leptin in relation to risk for preeclampsia: results from a large case-control study. <u>*Metabolism*</u>. 2011; 60:1539–1544.

**Dawson** AB, Kosters BA. Preimplantation changes in the uterine mucosa of the cat. <u>American Journal of Anatomy</u>. 1944; 75:1–37.

**Dean** M, Hunt J, McDougall L, Rose J. Uterine glycogen metabolism in mink during estrus, embryonic diapause and pregnancy. *Journal of Reproduction and Development*. 2014; 60:438–446.

**Deepa** SS, Dong LQ. APPL1: role in adiponectin signaling and beyond. <u>*American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism.* 2008; 296:22–36.</u>

**Delporte** ML, Brichard SM, Hermans MP, Beguin C, Lambert M. Hyperadiponectinaemia in anorexia nervosa. <u>*Clinical*</u> <u>Endocrinology</u>. 2003; 58:22–29.

**Demir** R, Kayisli UA, Celik-Ozenci C, Korgun ET, Demir-Weusten AY, Arici A. Structural differentiation of human uterine luminal and glandular epithelium during early pregnancy: An ultrastructural and immunohistochemical study. *Placenta*. 2002; 23:672–684.

**Deng** Y, Scherer PE. Adipokines as novel biomarkers and regulators of the metabolic syndrome. <u>Annals of the New York</u> <u>Academy of Sciences</u>. 2010; 1212:1–19.

**Denzel** MS, Scimia M-C, Zumstein PM, Walsh K, Ruiz-Lozano P, Ranscht B. T-cadherin is critical for adiponectin-mediated cardioprotection in mice. *Journal of Clinical Investigation*. 2010; 120:4342–4352.

**Dieudonne** M-N, Bussiere M, Santos E Dos, Leneveu M-C, Giudicelli Y, Pecquery R. Adiponectin mediates antiproliferative and apoptotic responses in human MCF7 breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006; 345:271–279.

**Dieudonne** M-N, Machinal-Quelin F, Serazin-Leroy V, Leneveu M-C, Pecquery R, Giudicelli Y. Leptin mediates a proliferative response in human MCF7 breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002; 293:622–628.

Dimier-Poisson I, Poutier L. Toxoplasmose et Femme enceinte: Interrogations et Conseils. 2010; EUE

**Ding** M, Xie Y, Wagner RJ, Jin Y, Carrao AC, Liu LS, Guzman AK, Powell RJ, Hwa J, Rzucidlo EM, et al. Adiponectin Induces Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation via Repression of Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 and FoxO4. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 2011; 31:1403–1410.

**Ding** Q, Ash C, Mracek T, Merry B, Bing C. Caloric restriction increases adiponectin expression by adipose tissue and prevents the inhibitory effect of insulin on circulating adiponectin in rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2012; 23:867–874.

**Diskin** M, Morris D. Embryonic and Early Foetal Losses in Cattle and Other Ruminants. *<u>Reproduction in Domestic Animals.</u>* 2008; 43:260–267.

**Dockery** P, Li TC, Rogers AW, Cooke ID, Lenton EA. The ultrastructure of the glandular epithelium in the timed endometrial biopsy. *Human Reproduction*. 1988; 3:826–834.

**Doran** AC, Meller N, Cutchins A, Deliri H, Slayton RP, Oldham SN, Kim JB, Keller SR, McNamara CA. The Helix-Loop-Helix Factors Id3 and E47 Are Novel Regulators of Adiponectin. <u>*Circulation Research*</u>. 2008; 103:624–634.

**Duan** D-M, Niu J-M, Lei Q, Lin X-H, Chen X. Serum levels of the adipokine chemerin in preeclampsia. *Journal of Perinatal Medicine*. 2011; 40:121–127.

Dupressoir A, Heidmann T. Les syncytines. Médecine/Sciences. 2011; 27:163-169.

**Ego** A. Définitions : petit poids pour l'âge gestationnel et retard de croissance intra-utérin. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction*. 2013; 42:872–894.

Elnashar AM, Aboul-Enein GI. Endometrial receptivity. *Middle East Fertility Society Journal*. 2004; 9:10–24.

**Evagelidou** EN, Giapros VI, Challa AS, Kiortsis DN, Tsatsoulis AA, Andronikou SK. Serum adiponectin levels, insulin resistance, and lipid profile in children born small for gestational age are affected by the severity of growth retardation at birth. *European Journal of Endocrinology*. 2007; 156:271–277.

Évain-Brion D. Aspects biologiques, moléculaires et cliniques de l'axe GH/IGF-I. 2012; Springer.

Evain-Brion D, Malassiné A. Le placenta humain. 2011; Lavoisier.

**Evans** J. Hyperglycosylated hCG: a Unique Human Implantation and Invasion Factor. <u>American Journal of Reproductive</u> <u>Immunology</u>. 2016; 75:3336340.

**Fallo** F, Scarda A, Sonino N, Paoletta A, Boscaro M, Pagano C, Federspil G, Vettor R. Effect of glucocorticoids on adiponectin: a study in healthy subjects and in Cushing's syndrome. *European Journal of Endocrinology*. 2004; 150:339–344.

**Fan** W, Yanase T, Nomura M, Okabe T, Goto K, Sato T, Kawano H, Kato S, Nawata H. Androgen receptor null male mice develop late-onset obesity caused by decreased energy expenditure and lipolytic activity but show normal insulin sensitivity with high adiponectin secretion. *Diabetes*. 2005; 54:1000–1008.

**Farley** DM, Choi J, Dudley DJ, Li C, Jenkins SL, Myatt L, Nathanielsz PW. Placental Amino Acid Transport and Placental Leptin Resistance in Pregnancies Complicated by Maternal Obesity. <u>*Placenta*</u>. 2010; 31:718–724.

**Farquhar** C, Rishworth JR, Brown J, Nelen WL, Marjoribanks J. Assisted reproductive technology: an overview of Cochrane Reviews. 2013; Cochrane.

Farquharson RG, Stephenson MD. Early pregnancy. 2017; Cambridge Medicine.

**Fasshauer** M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R. Adiponectin gene expression is inhibited by  $\beta$ -adrenergic stimulation via protein kinase A in 3T3-L1 adipocytes. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 2001; 507:142–146.

Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R. Hormonal Regulation of Adiponectin Gene Expression in 3T3-L1 Adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002; 290:1084–1089.

**Fasshauer** M, Waldeyer T, Seeger J, Schrey S, Ebert T, Kratzsch J, Lössner U, Blüher M, Stumvoll M, Faber R, et al. Circulating high-molecular-weight adiponectin is upregulated in preeclampsia and is related to insulin sensitivity and renal function. *European Journal of Endocrinology*. 2008; 158:197–201.

**Fernández-Sánchez** A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González A, Esquivel-Chirino C, Durante-Montiel I, Sánchez-Rivera G, Valadez-Vega C, Morales-González JA. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011; 12:3117–3132.

Fiaschi T, Cirelli D, Comito G, Gelmini S, Ramponi G, Serio M, Chiarugi P. Globular adiponectin induces differentiation and fusion of skeletal muscle cells. *Cell Research*. 2009; 19:584–597.

Filant J, Spencer TE. Uterine glands: biological roles in conceptus implantation, uterine receptivity and decidualization. *International Journal of Developmental Biology*. 2014; 58:107–116.

**Finucane** FM, Luan J, Wareham NJ, Sharp SJ, O'Rahilly S, Balkau B, Flyvbjerg A, Walker M, Højlund K, Nolan JJ, et al. Correlation of the leptin:adiponectin ratio with measures of insulin resistance in non-diabetic individuals. *Diabetologia*. 2009; 52:2345–2349.

**Foidart** JM, Schaaps JP, Chantraine F, Munaut C, Lorquet S. Dysregulation of anti-angiogenic agents (sFlt-1, PLGF, and sEndoglin) in preeclampsia?a step forward but not the definitive answer. *Journal of Reproductive Immunology.* 2009; 82:106–111.

Ford HB, Schust DJ. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. <u>*Review of Obstetrics & Gynecology.*</u> 2009; 2:76–83.

Foretz M, Taleux N, Guigas B, Horman S, Beauloye C, Andreelli F, Bertrand L, Viollet B. Régulation du métabolisme énergétique par l'AMPK. *Médecine/Sciences*. 2006; 22:381–388.

**Forte** M, Mita L, Cobellis L, Merafina V, Specchio R, Rossi S, Mita DG, Mosca L, Castaldi MA, Falco M De, et al. Triclosan and bisphenol a affect decidualization of human endometrial stromal cells. <u>*Molecular and Cellular Endocrinology.*</u> 2016; 422:74–83.

**Fouladi-Nashta** AA, Jones CJP, Nijjar N, Mohamet L, Smith A, Chambers I, Kimber SJ. Characterization of the uterine phenotype during the peri-implantation period for LIF-null, MF1 strain mice. *Developmental Biology*. 2005; 281:1–21.

Fournier T. Human chorionic gonadotropin: Different glycoforms and biological activity depending on its source of production. <u>Annales d'Endocrinologie</u>. 2016; 77:75-81.

**Frendo** J-L. Impacts de la différenciation trophoblastique : importance de la fusion dans le développement placentaire. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction.* 2008; 36:55–58.

**Fréour** T, Barrière P. Le mythe de la réserve ovarienne. *Extrait des Mises à jour en Gynécologie Médicale*. 2007; Tome XXXI:57–66.

Fried SK, DiGirolamo M. Lipoprotein lipase secretion from isolated rat fat cells of different size. *Life Science*. 1986; 39:2111–2119.

Fritz MA, Speroff L. Clinical gynecologic endocrinology and infertility. 2011; Williams & Wilkins.

**Fu** Y, Luo N, Klein RL, Garvey WT. Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *Journal of Lipid Research*. 2005; 46:1369–1379.

**Fuerst** M, Taylor CG, Wright B, Tworek L, Zahradka P. Inhibition of smooth muscle cell proliferation by adiponectin requires proteolytic conversion to its globular form. *Journal of Endocrinology*. 2012; 215:107–117.

**Fujita** H, Fujishima H, Koshimura J, Hosoba M, Yoshioka N, Shimotomai T, Morii T, Narita T, Kakei M, Ito S. Effects of antidiabetic treatment with metformin and insulin on serum and adipose tissue adiponectin levels in db/db mice. *Endocrine Journal.* 2005; 52:427–433.

**Fukuhara** A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, Matsuki Y, Murakami M, Ichisaka T, Murakami H, et al. Visfatin: A Protein Secreted by Visceral Fat That Mimics the Effects of Insulin. <u>Science.</u> 2005; 307:426–430.

Fumeron F. Adiponectine et insulino-résistance. Métabolismes Hormones Diabètes et Nutrition. 2004; 1:6-13.

Gaccioli F, Lager S. Placental Nutrient Transport and Intrauterine Growth Restriction. *Frontiers in Physiology*. 2016; 7:40.

Gaillard R. Maternal obesity during pregnancy and cardiovascular development and disease in the offspring. *European Journal* of *Epidemiology*, 2015; 30:1141–1152.

**Gamundi-Segura** S, Serna J, Oehninger S, Horcajadas JA, Arbones-Mainar JM. Effects of adipocyte-secreted factors on decidualized endometrial cells: modulation of endometrial receptivity in vitro. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 2015; 71:537–546.

**Garces** MF, Sanchez E, Ruíz-Parra AI, Rubio-Romero JA, Angel-Müller E, Suarez MA, Bohórquez LF, Bravo SB, Nogueiras R, Diéguez C, et al. Serum chemerin levels during normal human pregnancy. *Peptides*. 2013; 42:138–143.

Garlatti M, Barouki R. Le stress du reticulum endoplasmique: adaptation et toxicité. <u>Médecine/Sciences</u>. 2002; 18:585–594.

Garmi G, Goldman S, Shalev E, Salim R. The Effects of Decidual Injury on the Invasion Potential of Trophoblastic Cells. *Obstetrics and Gynecology*. 2011; 117:55–59.

Garmi G, Salim R. Epidemiology, etiology, diagnosis, and management of placenta accreta. <u>Obstetrics and Gynecology</u> <u>International.</u> 2012; 2012:873–929.

Garzia E, Borgato S, Cozzi V, Doi P, Bulfamante G, Persani L, Cetin I. Lack of expression of endometrial prolactin in early implantation failure: a pilot study. *Human Reproduction.* 2004; 19:1911–1916.

**Gavrila** A, Peng C-K, Chan JL, Mietus JE, Goldberger AL, Mantzoros CS. Diurnal and Ultradian Dynamics of Serum Adiponectin in Healthy Men: Comparison with Leptin, Circulating Soluble Leptin Receptor, and Cortisol Patterns. <u>Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism</u>. 2003; 88:2838–2843.

Gellersen B, Brosens IIAIA, Brosens JJ. Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives. *Seminars in Reproductive Medicine*. 2007; 25:445–453.

Gellersen B, Brosens JJ. Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair. *Journal of Endocrinology*. 2003; 178:357–372.

**Gellersen** B, Brosens JJ. Cyclic Decidualization of the Human Endometrium in Reproductive Health and Failure. <u>*Endocrine*</u> <u>*Reviews.*</u> 2014; 35:851–905.

Genbacev O. Regulation of Human Placental Development by Oxygen Tension. Science. 1997; 277:1669–1672.

Genbacev O, Joslin R, Damsky CH, Polliotti BM, Fisher SJ. Hypoxia Alters Early Gestation Human Cytotrophoblast Differentiation/Invasion In Vitro and Models the Placental Defects that Occur in Preeclampsia. *Journal of Clinical Investigation*. 1996; 97:540–550.

**Getsios** S, MacCalman CD. Cadherin-11 modulates the terminal differentiation and fusion of human trophoblastic cells in vitro. *Developmental Biology*. 2003; 257:41–54.

Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *Federation of European Biochemical Societies Journal*. 2011; 278:16–27.

**Gielen** SCJP, Santegoets LAM, Kühne LCM, Ijcken WFJ Van, Boers-Sijmons B, Hanifi-Moghaddam P, Helmerhorst TJM, Blok LJ, Burger CW. Genomic and nongenomic effects of estrogen signaling in human endometrial cells: involvement of the growth factor receptor signaling downstream AKT pathway. *Reproductive Science*. 2007; 14:646–654.

Gilbert S. Early mammalian development. *Developmental Biology*. 2000; 108:90-97.

**Goldsmith** LT, Weiss G. Relaxin in human pregnancy. <u>Annals of the New York Academy of Sciences</u>. 2009; 1160:130–135. NIH Public Access.

**González-Recio** O, Pérez-Cabal MA, Alenda R. Economic Value of Female Fertility and its Relationship with Profit in Spanish Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*. 2004; 87:3053–3061.

Goralski KB, McCarthy TC, Hanniman EA, Zabel BA, Butcher EC, Parlee SD, Muruganandan S, Sinal CJ. Chemerin, a Novel Adipokine That Regulates Adipogenesis and Adipocyte Metabolism. *Journal of Biological Chemistry*. 2007; 282:28175–28188.

Gorvin CM. The prolactin receptor: Diverse and emerging roles in pathophysiology. *Journal of Clinical and Translational* <u>Endocrinology</u>. 2015; 2:85–91.
**Gottschalk** C, Malberg K, Arndt M, Schmitt J, Roessner A, Schultze D, Kleinstein J, Ansorge S. Matrix metalloproteinases and TACE play a role in the pathogenesis of endometriosis. <u>Advances in Experimental Medicine and Biology</u>. 2000; 477:483–486.

**Graham** CH, Connelly I, MacDougall JR, Kerbel RS, Stetler-Stevenson WG, Lala PK. Resistance of Malignant Trophoblast Cells to both the Anti-proliferative and Anti-invasive Effects of Transforming Growth Factor-β. *Experimental Cell Research*. 1994; 214:93–99.

**Gray** CA, Burghardt RC, Johnson GA, Bazer FW, Spencer TE. Evidence that absence of endometrial gland secretions in uterine gland knockout ewes compromises conceptus survival and elongation. <u>*Reproduction*</u>. 2002; 124:289–300.

**Gregor** MF, Hotamisligil GS. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *Journal of Lipid Research*. 2007; 48:1905–1914.

Griffiths SK, Campbell JP. Placental structure, function and drug transfer. <u>Continuing Education in Anaesthesia Critical Care</u> <u>& Pain</u>. 2015; 2:84–89.

**Gude** NM, Roberts CT, Kalionis B, King RG. Growth and function of the normal human placenta. <u>*Thrombosis Research.*</u> 2004; 114:397–407.

Gullicksen PS, Della-Fera MA, Baile CA. Leptin-induced adipose apoptosis: Implications for body weight regulation. *Apoptosis.* 2003; 8:327–335.

**Guo** R, Zhang Y, Turdi S, Ren J. Adiponectin knockout accentuates high fat diet-induced obesity and cardiac dysfunction: Role of autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2013; 1832:1136–1148.

**Gupta** SK. Role of zona pellucida glycoproteins during fertilization in humans. *Journal of Reproductive Immunology*. 2015; 108:90–97.

**Guzeloglu-Kayisli** O, Kayisli UA, Taylor HS. The role of growth factors and cytokines during implantation: endocrine and paracrine interactions. <u>Seminars in Reproductive Medicine</u>, 2009; 27:62–79.

Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM. Weightreducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. <u>Science</u>. 1995; 269:543–546.

Halasz M, Szekeres-Bartho J. The role of progesterone in implantation and trophoblast invasion. *Journal of Reproductive Immunology*. 2013; 97:43–50.

Han Y, Zheng Y, Fan Y, Liu M, Lu X, Tao Q. Association of adiponectin gene polymorphism 45TG with gestational diabetes mellitus diagnosed on the new IADPSG criteria, plasma adiponectin levels and adverse pregnancy outcomes. <u>*Clinical and Experimental Medicine*</u>. 2015; 15:47–53.

**Handschuh** K, Guibourdenche J, Tsatsaris V, Guesnon M, Laurendeau I, Evain-Brion D, Fournier T. Human Chorionic Gonadotropin Produced by the Invasive Trophoblast But Not the Villous Trophoblast Promotes Cell Invasion and Is Down-Regulated by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma <u>Endocrinology</u>. 2007; 148:5011–5019.

Hanssens S, Salzet M, Vinatier D. Aspects immunologiques de la grossesse. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction.* 2012; 41:595–611.

Harada O, Suga T, Suzuki T, Nakamoto K, Kobayashi M, Nomiyama T, Nadano D, Ohyama C, Fukuda MN, Nakayama J. The role of trophinin, an adhesion molecule unique to human trophoblasts, in progression of colorectal cancer. *International Journal of Cancer*. 2007; 121:1072–1078.

Haroun HS. Intrauterine Growth Restriction. Anatomy Physiology and Biochemistry International Journal. 2017; 1:1-5.

Harris J, Stanford PM, Oakes SR, Ormandy CJ. Prolactin and the prolactin receptor: new targets of an old hormone. <u>Annals</u> of <u>Medicine</u>, 2004; 36:414–425.

Harris L, Jones C, Aplin J. Adhesion molecules in human trophoblast - A review. *Placenta*. 2009; 4:293-298.

Hasler JF. Bovine embryo transfert: are efficiencies improving ? 2010. Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle.

Hauner H. Secretory factors from human adipose tissue and their functional role. <u>*Proceedings of the Nutrition Society.*</u> 2005; 64:163–169.

Hayward CE, Greenwood SL, Sibley CP, Baker PN, Challis JRG, Jones RL. Effect of maternal age and growth on placental nutrient transport: potential mechanisms for teenagers' predisposition to small-for-gestational-age birth? <u>American Journal of</u> <u>Physiology, Endocrinology and Metabolism</u>. 2012; 302:233–242.

**He** W, Barak Y, Hevener A, Olson P, Liao D, Le J, Nelson M, Ong E, Olefsky JM, Evans RM. Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003; 100:15712–15717.

**Hempstock** J, Cindrova-Davies T, Jauniaux E, Burton GJ. Endometrial glands as a source of nutrients, growth factors and cytokines during the first trimester of human pregnancy: a morphological and immunohistochemical study. <u>*Reproductive Biology and Endocrinology*</u>. 2004; 2:58.

**Henau** O De, Degroot G-N, Imbault V, Robert V, Poorter C De, Mcheik S, Galés C, Parmentier M, Springael J-Y. Signaling Properties of Chemerin Receptors CMKLR1, GPR1 and CCRL2. *PLoS One*. 2016; 11:164-179.

Holtan SG, Creedon DJ, Haluska P, Markovic SN. Cancer and pregnancy: parallels in growth, invasion, and immune modulation and implications for cancer therapeutic agents. *Mayo Clinic Proceedings*. 2009; 84:985–1000.

Horosz E, Bomba-Opon DA, Szymanska M, Wielgos M. Third trimester plasma adiponectin and leptin in gestational diabetes and normal pregnancies. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2011; 93:350–356.

Howard JM, Pidgeon GP, Reynolds J V. Leptin and gastro-intestinal malignancies. *Obesity Reviews*. 2010; 11:863-874.

Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *Journal of Biological Chemistry*. 1996; 271:10697–10703.

Hu R, Jin H, Zhou S, Yang P, Li X. Proteomic Analysis of Hypoxia-Induced Responses in the Syncytialization of Human Placental Cell Line BeWo. *Placenta*. 2007; 28:399–407.

**Huber** AV, Saleh L, Bauer S, Husslein P, Knöfler M. TNFα-Mediated Induction of PAI-1 Restricts Invasion of HTR-8/SVneo Trophoblast Cells. *Placenta*. 2006; 27:127–136.

Huckle WR. Molecular biology of placental development and disease. 2017; Elsevier.

Hug C, Wang J, Ahmad NS, Bogan JS, Tsao T-S, Lodish HF. T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecularweight forms of Acrp30/adiponectin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004; 101:10308–10313.

**Huppertz** B, Kertschanska S, Demir AY, Frank HG, Kaufmann P. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases (MMP), their substrates, and their inhibitors (TIMP) during trophoblast invasion in the human placenta. <u>*Cell Tissue Research.*</u> 1998; 291:133–148.

Huppertz B, Kingdom JCP. Apoptosis in the Trophoblast Role of Apoptosis in Placental Morphogenesis. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 2004; 11:353–362.

Hustin J, Schaaps JP. Echographic [corrected] and anatomic studies of the maternotrophoblastic border during the first trimester of pregnancy. <u>American Journal of Obstetrics & Gynecology</u>. 1987; 157:162–168.

Ichim G, Tait SWG. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. Nature Reviews Cancer. 2016; 16:539-548.

**Illiano** M, Nigro E, Sapio L, Caiafa I, Spina A, Scudiero O, Bianco A, Esposito S, Mazzeo F, Pedone PV, et al. Adiponectin down-regulates CREB and inhibits proliferation of A549 lung cancer cells. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*. 2017; 45:114–120.

**Imagawa** A, Funahashi T, Nakamura T, Moriwaki M, Tanaka S, Nishizawa H, Sayama K, Uno S, Iwahashi H, Yamagata K, et al. Elevated serum concentration of adipose-derived factor, adiponectin, in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2002; 25:1665–1666.

**Imbeault** P. Environmental influences on adiponectin levels in humans. <u>Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism</u>. 2007; 32:505–511.

**Imbeault** P, Pomerleau M, Harper ME, Doucet E. Unchanged fasting and postprandial adiponectin levels following a 4-day caloric restriction in young healthy men. <u>*Clinical Endocrinology*</u>. 2004; 60:429–433.

**Inazumi** T, Shirata N, Morimoto K, Takano H, Segi-Nishida E, Sugimoto Y. Prostaglandin E<sub>2</sub>-EP4 signaling suppresses adipocyte differentiation in mouse embryonic fibroblasts via an autocrine mechanism. *Journal of Lipid Research*. 2011; 52:1500–1508.

**İnci** S, Aksan G, Doğan P. Chemerin as an independent predictor of cardiovascular event risk. *Therapeutic advances in endocrinology and metabolism.* 2016;7:57–68. SAGE Publications.

Irwin JC, Kirk D, King RJ, Quigley MM, Gwatkin RB. Hormonal regulation of human endometrial stromal cells in culture: an in vitro model for decidualization. *Fertility and Sterility*. 1989; 52:761–768.

Irwin JC, Suen L-F, Martina NA, Mark SP, Giudice LC. Role of the IGF system in trophoblast invasion and pre-eclampsia. *Human Reproduction*. 1999; 14:90–96.

**Israël** A. The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. <u>*Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.*</u> 2010; 2:a000158.

**Iwabu** M, Yamauchi T, Okada-Iwabu M, Sato K, Nakagawa T, Funata M, Yamaguchi M, Namiki S, Nakayama R, Tabata M, et al. Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1alpha and mitochondria by Ca(2+) and AMPK/SIRT1. <u>Nature</u>. 2010; 464:1313–1319.

Iwaki M, Matsuda M, Maeda N, Funahashi T, Matsuzawa Y, Makishima M, Shimomura I. Induction of Adiponectin, a Fat-Derived Antidiabetic and Antiatherogenic Factor, by Nuclear Receptors. *Diabetes.* 2003; 52:1655–1663.

Iwashima Y, Katsuya T, Ishikawa K, Kida I, Ohishi M, Horio T, Ouchi N, Ohashi K, Kihara S, Funahashi T, et al. Association of Hypoadiponectinemia With Smoking Habit in Men. *Hypertension*. 2005; 45:1094–1100.

**Izadi** V, Farabad E, Azadbakht L. Serum adiponectin level and different kinds of cancer: a review of recent evidence. *International Scholarly Research Notices Oncology*. 2012; 2012;982769.

Jabbour HN, Critchley HO. Potential roles of decidual prolactin in early pregnancy. <u>Reproduction</u>, 2001; 121:197–205.

Jacqz-Aigrain E. Médecine thérapeutique / pédiatrie. 1998.

**Jahn** E, Classen-Linke I, Kusche M, Beier HM, Traub O, Grümmer R, Winterhager E. Expression of gap junction connexins in the human endometrium throughout the menstrual cycle. *Human Reproduction*. 1995; 10:2666–2670.

Jansson N, Greenwood SL, Johansson BR, Powell TL, Jansson T. Leptin Stimulates the Activity of the System A Amino Acid Transporter in Human Placental Villous Fragments. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2003; 88:1205–1211.

Jansson T, Aye ILMH, Goberdhan DCI. The emerging role of mTORC1 signaling in placental nutrient-sensing. *Placenta*. 2012; 33 S2:e23-9.

Jensen D V, Andersen KB, Wagner G. Prostaglandins in the menstrual cycle of women. A review. *Danish Medical Bulletin.* 1987; 34:178–182.

Jo Y, Im J. Adiponectin Level in Non-Pregnant Women, Pregnant Women without Diabetes and Pregnant Women with Diabetes. *Journal of Biomedical Science*, 2008; 14:233–238.

Johnson MH, Everitt BJ. Reproduction. 2002; De Boeck université.

Jones CJPJP, Choudhury RHH, Aplin JDD. Tracking nutrient transfer at the human maternofetal interface from 4 weeks to term. *Placenta*. 2015; 36:372–380.

**Jones** HN, Jansson T, Powell TL. Full-length adiponectin attenuates insulin signaling and inhibits insulin-stimulated amino Acid transport in human primary trophoblast cells. *Diabetes*. 2010; 59:1161–1170.

Jornayvaz FR, Shulman GI. Regulation of mitochondrial biogenesis. Essays in Biochemistry, 2010; 47:69-84.

Junquero D, Rival Y. Syndrome métabolique: Quelle définition pour quel(s) traitement(s)? <u>Médecine/Sciences</u>. 2005; 21:1045–1053.

**Kaarniranta** K, Paananen J, Nevalainen T, Sorri I, Seitsonen S, Immonen I, Salminen A, Pulkkinen L, Uusitupa M. Adiponectin receptor 1 gene (ADIPOR1) variant is associated with advanced age-related macular degeneration in Finnish population. *Neuroscience Letters.* 2012; 513:233–237.

Kadyrov M, Kingdom JCP, Huppertz B. Divergent trophoblast invasion and apoptosis in placental bed spiral arteries from pregnancies complicated by maternal anemia and early-onset preeclampsia/intrauterine growth restriction. <u>American Journal</u> <u>of Obstetrics & Gynecology</u>. 2006; 194:557–563.

Kamigaki M, Sakaue S, Tsujino I, Ohira H, Ikeda D, Itoh N, Ishimaru S, Ohtsuka Y, Nishimura M. Oxidative stress provokes atherogenic changes in adipokine gene expression in 3T3-L1 adipocytes. <u>Biochemical and Biophysical Research</u> <u>Communications</u>. 2006; 339:624–632.

Kampmann U, Madsen LR, Skajaa GO, Iversen DS, Moeller N, Ovesen P. Gestational diabetes: A clinical update. *World Journal of Diabetes*. 2015; 6:1065–1072.

Kanda Y, Matsuda M, Tawaramoto K, Kawasaki F, Hashiramoto M, Matsuki M, Kaku K. Effects of sulfonylurea drugs on adiponectin production from 3T3-L1 adipocytes: Implication of different mechanism from pioglitazone. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2008; 81:13–18.

**Kaneko** H, Anzai T, Nagai T, Anzai A, Takahashi T, Mano Y, Morimoto K, Maekawa Y, Itoh H, Yoshikawa T, et al. Human C-reactive protein exacerbates metabolic disorders in association with adipose tissue remodelling. *Cardiovascular Reasearch.* 2011; 91:546–555.

Karbowska J, Kochan Z. Role of adiponectin in the regulation of carbohydrate and lipid metabolism. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2006;57 Suppl 6:103–113.

**Karrasch** T, Spaeth T, Neumeier M, Schaeffler A, Scholmerich J, Buechler C. W1671 Adiponectin Inhibits Cell Migration But Stimulates Cell Proliferation of Intestinal Epithelial CACO-2 Cells. *Gastroenterology*. 2009; 136:A-714.

Kashima H, Shiozawa T, Miyamoto T, Suzuki A, Uchikawa J, Kurai M, Konishi I. Autocrine stimulation of IGF1 in estrogeninduced growth of endometrial carcinoma cells: involvement of the mitogen-activated protein kinase pathway followed by upregulation of cyclin D1 and cyclin E. <u>Endocrine-Related Cancer</u>. 2008; 16:113–122.

Kashimada K, Koopman P. Sry: the master switch in mammalian sex determination. *Development*. 2010; 137:3921–3930.

Kaufmann P, Black S, Huppertz B. Endovascular Trophoblast Invasion: Implications for the Pathogenesis of Intrauterine Growth Retardation and Preeclampsia. *Biology of Reproduction*. 2003; 69:1–7.

Kavitha J V., Rosario FJ, Nijland MJ, McDonald TJ, Wu G, Kanai Y, Powell TL, Nathanielsz PW, Jansson T. Down-regulation of placental mTOR, insulin/IGF-I signaling, and nutrient transporters in response to maternal nutrient restriction in the baboon. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*. 2014; 28:1294–1305.

Kawai K, Kageyama A, Tsumano T, Nishimoto S, Fukuda K, Yokoyama S, Oguma T, Fujita K, Yoshimoto S, Yanai A, et al. Effects of adiponectin on growth and differentiation of human keratinocytes. Implication of impaired wound healing in diabetes. *Biochemical and Biophysical Reaserch Communications*. 2008; 374:269–273.

Kawwass JF, Summer R, Kallen CB. Direct effects of leptin and adiponectin on peripheral reproductive tissues: a critical review. *Molecular Human Reproduction*. 2015; 21:617–632.

Khosrowbeygi A, Ahmadvand H. Maternal serum levels of adiponectin in preeclampsia. *Journal of Ayub Medical College* <u>Abbottabad</u>. 2009; 21:79–82.

**Khoury** M, Giral P, Bruckert Ã, Chapman J, Beaudeux J-L. Le système MMP/TIMP : une cible thérapeutique de l'athérosclérose ? *Sang, Thrombose, Vaisseaux*. 2006; 5:247–256.

Kierszenbaum AL. Histologie et biologie cellulaire : une introduction à l'anatomie pathologique. 2006; De Boeck.

Kim HB, Kong M, Kim TM, Suh YH, Kim W-H, Lim JH, Song JH, Jung MH. NFATc4 and ATF3 negatively regulate adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes*. 2006; 55:1342–1352.

**Kim** HS, Cho SH, Kwon HS, Sohn IS, Hwang HS. The significance of placental ratios in pregnancies complicated by small for gestational age, preeclampsia, and gestational diabetes mellitus. *<u>Obstetrics and Gynecology Science</u>*. 2014; 57:358–366.

**Kissebah** AH, Sonnenberg GE, Myklebust J, Goldstein M, Broman K, James RG, Marks JA, Krakower GR, Jacob HJ, Weber J, et al. Quantitative trait loci on chromosomes 3 and 17 influence phenotypes of the metabolic syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000; 97:14478–14483.

Kleiblová P, Springer D, Haluzík M. The influence of hormonal changes during menstrual cycle on serum adiponectin concentrations in healthy women. *Physiological Research*. 2006; 55:661–666.

Kleinstein J, Westermann W, Mennenga K, Gustmann C, Gips H. Estrogen Induces Expression of Endometrial Epidermal Growth Factor Receptors Before Implantation. <u>American Journal of Reproductive Immunology</u>. 1993; 30:58–62.

Klemmt PAB, Carver JG, Kennedy SH, Koninckx PR, Mardon HJ. Stromal cells from endometriotic lesions and endometrium from women with endometriosis have reduced decidualization capacity. *Fertility and Sterility.* 2006; 85:564–572.

**Kloting** N, Koch L, Wunderlich T, Kern M, Ruschke K, Krone W, Bruning JC, Bluher M. Autocrine IGF-1 Action in Adipocytes Controls Systemic IGF-1 Concentrations and Growth. *Diabetes*. 2008; 57:2074–2082.

**Knöfler** M. Critical growth factors and signaling pathways controlling human trophoblast invasion. *International Journal of Developmental Biology*. 2010; 54:269–280.

Konishi M, Haraguchi G, Ohigashi H, Ishihara T, Saito K, Nakano Y, Isobe M. Adiponectin protects against doxorubicininduced cardiomyopathy by anti-apoptotic effects through AMPK up-regulation. *Cardiovascular Research*. 2011; 89:309–319.

Kos K, Harte AL, Silva NF da, Tonchev A, Chaldakov G, James S, Snead DR, Hoggart B, O'Hare JP, McTernan PG, et al. Adiponectin and Resistin in Human Cerebrospinal Fluid and Expression of Adiponectin Receptors in the Human Hypothalamus. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2007; 92:1129–1136.

**Krenzer** S, Fluhr H, Deperschmidt M, Zwirner M, Wallwiener D, Licht P. Regulation of TIMP-1, -2 and -3 in human endometrial stromal cells during decidualization and under the influence of hCG. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*. 2006; 114:07–086.

**Kumada** M, Kihara S, Sumitsuji S, Kawamoto T, Matsumoto S, Ouchi N, Arita Y, Okamoto Y, Shimomura I, Hiraoka H, et al. Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. <u>Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular</u> <u>Biology</u>. 2003; 23:85–89.

**Kurita** T, Young P, Brody JR, Lydon JP, O'Malley BW, Cunha GR. Stromal progesterone receptors mediate the inhibitory effects of progesterone on estrogen-induced uterine epithelial cell deoxyribonucleic acid synthesis. *Endocrinology*. 1998; 139:4708–4713.

**Kyriakakou** M, Malamitsi-Puchner A, Militsi H, Boutsikou T, Margeli A, Hassiakos D, Kanaka-Gantenbein C, Papassotiriou I, Mastorakos G. Leptin and adiponectin concentrations in intrauterine growth restricted and appropriate for gestational age fetuses, neonates, and their mothers. *European Journal of Endocrinology*. 2008; 158:343–348.

Lacquemant C, Vasseur F, Leprêtre F, Froguel P. Cytokines d'origine adipocytaire, obésité et développement du diabète. <u>Cytokines</u>. 2003; 809–817.

Lagaly DV, Aad PY, Grado-Ahuir JA, Hulsey LB, Spicer LJ. Role of adiponectin in regulating ovarian theca and granulosa cell function. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2008; 284:38–45.

Lager S, Powell TL. Regulation of nutrient transport across the placenta. Journal of Pregnancy. 2012; 1–14.

**Lago** R, Gomez R, Otero M, Lago F, Gallego R, Dieguez C, Gomez-Reino JJ, Gualillo O. A new player in cartilage homeostasis: adiponectin induces nitric oxide synthase type II and pro-inflammatory cytokines in chondrocytes. <u>Osteoarthritis</u> <u>and Cartilage</u>. 2008; 16:1101–1109.

Laigaard J, Sørensen T, Placing S, Holck P, Fröhlich C, Wøjdemann KR, Sundberg K, Shalmi A-C, Tabor A, Nørgaard-Pedersen B, et al. Reduction of the Disintegrin and Metalloprotease ADAM12 in Preeclampsia. <u>*Obstetrics and Gynecology.*</u> 2005; 106:144–149.

Lain KY, Daftary AR, Ness RB, Roberts JM. First trimester adipocytokine concentrations and risk of developing gestational diabetes later in pregnancy. *Clinical Endocrinology*. 2008; 69:407–411.

Lala PK, Lee BP, Xu G, Chakraborty C. Human placental trophoblast as an in vitro model for tumor progression. <u>*Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.*</u> 2002; 80:142–149.

**Lambot** N, Lybaert P, Boom A, Delogne-Desnoeck J, Vanbellinghen AM, Graff G, Lebrun P, Meuris S. Evidence for a clathrin-mediated recycling of albumin in human term placenta. *Biology of Reproduction.* 2006; 75:90–97.

Lamki RS al, Skepper JN, Burton GJ. Are human placental bed giant cells merely aggregates of small mononuclear trophoblast cells? An ultrastructural and immunocytochemical study. *Human Reproduction.* 1999; 14:496–504.

Lanfranco F, Zitzmann M, Simoni M, Nieschlag E. Serum adiponectin levels in hypogonadal males: influence of testosterone replacement therapy. *Clinical Endocrinology*. 2004; 60:500–507.

**Lappas** M, Permezel M, Rice GE. Leptin and Adiponectin Stimulate the Release of Proinflammatory Cytokines and Prostaglandins from Human Placenta and Maternal Adipose Tissue via Nuclear Factor-κB, Peroxisomal Proliferator-Activated Receptor-γ and Extracellularly Regulated Kinase 1/2. *Endocrinology*. 2005; 146:3334–3342.

Large MJ, DeMayo FJ. The regulation of embryo implantation and endometrial decidualization by progesterone receptor signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2012; 358:155–165.

Lash GE, Otun HA, Innes BA, Bulmer JN, Searle RF, Robson SC. Inhibition of Trophoblast Cell Invasion by TGFB1, 2, and 3 Is Associated with a Decrease in Active Proteases1. *Biology of Reproduction*. 2005; 73:374–381.

Lazar L, Meyerovitch J, Vries L de, Phillip M, Lebenthal Y. Treated and untreated women with idiopathic precocious puberty: long-term follow-up and reproductive outcome between the third and fifth decades. <u>*Clinical Endocrinology*</u>. 2014; 80:570–576.

Lea RG, Howe D, Hannah LT, Bonneau O, Hunter L, Hoggard N. Placental leptin in normal, diabetic and fetal growth-retarded pregnancies. *Molecular Human Reproduction*. 2000; 6:763–769.

Leddy MA, Power ML, Schulkin J. The impact of maternal obesity on maternal and fetal health. <u>*Reviews in Obstetrics and Gynecology*</u>. 2008; 1:170–178.

Lédée N, Petitbarat M, Vezmar K, Vitoux D, Rahmati M, Bensussan A, Chaouat G, Balet R. Préparer l'endomètre à l'implantation embryonnaire en adaptant les traitements au profil immunologique endométrial de la patiente. <u>Médecine de la</u> <u>Reproduction, Gynécologie Endocrinologie</u>. 2014; 16:150-159.

Lédée-Bataille N, Dubanchet S, Zourbas S, Haydont V, Chaouat G. La tolérance materno-fœtale. <u>Médecine Thérapeutique</u>. 2001; 7:556-561.

Ledoux S, Campos DB, Lopes FL, Dobias-Goff M, Palin M-F, Murphy BD. Adiponectin induces periovulatory changes in ovarian follicular cells. *Endocrinology*. 2006; 147:5178–5186.

Lee C-L, Chiu PCN, Hautala L, Salo T, Yeung WSB, Stenman U-H, Koistinen H. Human chorionic gonadotropin and its free β-subunit stimulate trophoblast invasion independent of LH/hCG receptor. <u>*Molecular and Cellular Endocrinology*</u>. 2013; 375:43–52.

Lee G-H, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*. 1996; 379:632–635.

Lee HW, Kim SY, Kim AY, Lee EJ, Choi J-Y, Kim JB. Adiponectin Stimulates Osteoblast Differentiation Through Induction of COX2 in Mesenchymal Progenitor Cells. <u>Stem Cells</u>. 2009; 27:2254–2262.

Lee S, Lee H-C, Kwon Y-W, Lee SE, Cho Y, Kim J, Lee S, Kim J-Y, Lee J, Yang H-M, et al. Adenylyl cyclase-associated protein 1 is a receptor for human resistin and mediates inflammatory actions of human monocytes. <u>*Cell Metabolism.*</u> 2014; 19:484–497.

Lehr S, Hartwig S, Sell H. Adipokines: a treasure trove for the discovery of biomarkers for metabolic disorders. *Proteomics: Clinical Applications.* 2012; 6:91–101.

**Lejeune** V. Fausses-couches spontanées répétées : bilan étiologique et prise en charge des grossesses ultérieures. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction.* 2010; 39:11–16.

**Lembo** G, Vecchione C, Fratta L, Marino G, Trimarco V, D'amati G, Tr B. Leptin Induces Direct Vasodilation Through Distinct Endothelial Mechanisms. *Diabetes*. 2000; 49:293–297.

Leroy E. Toxoplasmose: Définition, symptômes et complications possibles. 2016; Leroy Agency Press.

Leroy P, Dessolin S, Villageois P, Moon BC, Friedman JM, Ailhaud G, Dani C. Expression of ob gene in adipose cells. Regulation by insulin. *Journal of Biological Chemistry*. 1996; 271:2365–2368.

Lesourd F. Régulation endocrine et paracrine des fonctions ovariennes. 2014.

Li H, Li H, Bai L, Yu H. Lefty inhibits in vitro decidualization by regulating P57 and cyclin D1 expressions. *Cell Biochemistry and Function.* 2014; 32:657–664.

Li R, Wang W-Q, Zhang H, Yang X, Fan Q, Christopher TA, Lopez BL, Tao L, Goldstein BJ, Gao F, et al. Adiponectin improves endothelial function in hyperlipidemic rats by reducing oxidative/nitrative stress and differential regulation of eNOS/iNOS activity. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism.* 2007; 293:1703–1708.

**Lissauer** D, Eldershaw SA, Inman CF, Coomarasamy A, Moss PAH, Kilby MD. Progesterone promotes maternal-fetal tolerance by reducing human maternal T-cell polyfunctionality and inducing a specific cytokine profile. *European Journal of Immunology*. 2015; 45:2858–2872.

Liu J, Maccalman CD, Wang Y, Leung PCK. Promotion of human trophoblasts invasion by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) I and GnRH II via distinct signaling pathways. *Molecular Endocinology*. 2009; 23:1014–1021.

Liu M, Liu F. Transcriptional and post-translational regulation of adiponectin. *Biochemical Journal*. 2010; 425:41–52.

Liu Q, Yuan B, Lo KA, Patterson HC, Sun Y, Lodish HF. Adiponectin regulates expression of hepatic genes critical for glucose and lipid metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012; 109:14568–14573.

Liu S, Wang J, Qin H-M, Yan X-M, Yang X-S, Liu C, Yan Q. LIF upregulates poFUT1 expression and promotes trophoblast cell migration and invasion at the fetal-maternal interface. *Cell Death and Disease*. 2014; 5:e1396.

Liu Y, Sen S, Wannaiampikul S, Palanivel R, Hoo RLC, Isserlin R, Bader GD, Tungtrongchitr R, Deshaies Y, Xu A, et al. Metabolomic profiling in liver of adiponectin-knockout mice uncovers lysophospholipid metabolism as an important target of adiponectin action. *Biochemical Journal*. 2015; 469:71–82.

Lkhider M, Seddiki T, Ollivier-Bousquet M. La prolactine et son fragment 16 kDa dans les tissus de mammifères. <u>Médecine/Sciences.</u> 2010; 26:1049-1055.

Logan PC, Steiner M, Ponnampalam AP, Mitchell MD. Cell Cycle Regulation of Human Endometrial Stromal Cells During Decidualization. *<u>Reproductive Sciences</u>*, 2012; 19:883–894.

Loke YW, King A. Human implantation : cell biology and immunology. 1995; Cambridge University Press.

Lucas ES, Dyer NP, Murakami K, Lee HY, Chan Y-W, Grimaldi G, Muter J, Brighton PJ, Moore JD, Patel G, et al. Loss of Endometrial Plasticity in Recurrent Pregnancy Loss. *Stem Cells.* 2016; 34:346–356.

Lucy MC. Reproductive Loss in High-Producing Dairy Cattle: Where Will It End? *Journal of Dairy Science*. 2001; 84:1277–1293.

Lüllmann-Rauch R. Histologie. 2008; De Boeck.

Lunghi L, Ferretti ME, Medici S, Biondi C, Vesce F. Control of human trophoblast function. <u>*Reproductive Biology and Endocrinology*</u>, 2007; 5:6.

Lyden TW, Anderson CL, Robinson JM. The endothelium but not the syncytiotrophoblast of human placenta expresses caveolae. *Placenta*. 2002; 23:640–652.

**Ma** W, Song H, Das SK, Paria BC, Dey SK. Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003; 100:2963–2968.

MacCalman CD, Getsios S, Chen GT. Type 2 cadherins in the human endometrium and placenta: their putative roles in human implantation and placentation. <u>American Journal of Reproductive Immunology</u>, 1998; 39:96–107.

**Macdonald** LJ, Sales KJ, Grant V, Brown P, Jabbour HN, Catalano RD. Prokineticin 1 induces Dickkopf 1 expression and regulates cell proliferation and decidualization in the human endometrium. <u>*Molecular Human Reproduction.*</u> 2011; 17:626–636.

**MacDougald** OA, Hwang CS, Fan H, Lane MD. Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1995; 92:9034–9037.

**Machado** JSR, Palei ACT, Amaral LM, Bueno AC, Antonini SR, Duarte G, Tanus-Santos JE, Sandrim VC, Cavalli RC. Polymorphisms of the adiponectin gene in gestational hypertension and pre-eclampsia. *Journal of Human Hypertension*. 2014; 28:128–132.

**Machinal-Quélin** F, Dieudonné MN, Leneveu MC, Pecquery R, Giudicelli Y. Proadipogenic effect of leptin on rat preadipocytes in vitro: activation of MAPK and STAT3 signaling pathways. <u>*American Journal of Cell Physiology*</u>. 2002; 282:853–863.

Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K. cDNA Cloning and Expression of a Novel Adipose Specific Collagen-like Factor, apM1 (AdiposeMost Abundant Gene Transcript 1). <u>Biochemical and Biophysical Research Communications</u>. 1996; 221:286–289.

**Maeda** N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, Furuyama N, Kondo H, Takahashi M, Arita Y, et al. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. <u>*Nature Medicine*</u>. 2002; 8:731–737.

**Maeyama** M, Sudo I, Saito K, Matsuo I, Nakahara K. Glycogen estimation by a rapid enzymic method in very small samples of human endometrium: glycogen content in the endometrium of infertile patients during the menstrual cycle. *Fertility and Sterility*. 1977; 28:159–162.

**Magee** TR, Ross MG, Wedekind L, Desai M, Kjos S, Belkacemi L. Gestational diabetes mellitus alters apoptotic and inflammatory gene expression of trophobasts from human term placenta. *Journal of Diabetic Complications*. 2014; 28:448–459.

Mahdi WKM, Mohammed MS, Sanad AS. Association of Polycystic Ovary Syndrome and Adiponectin Gene Polymorphisms. <u>Archives of Clinical Microbiology.</u> 2016; 2:14–16. **Maillard** V, Uzbekova S, Guignot F, Perreau C, Ramé C, Coyral-Castel S, Dupont J. Effect of adiponectin on bovine granulosa cell steroidogenesis, oocyte maturation and embryo development. *<u>Reproductive Biology and Endocrinology</u>*. 2010; 8:23–35.

**Majuri** A, Santaniemi M, Rautio K, Kunnari A, Vartiainen J, Ruokonen A, Kesaniemi YA, Tapanainen JS, Ukkola O, Morin-Papunen L. Rosiglitazone treatment increases plasma levels of adiponectin and decreases levels of resistin in overweight women with PCOS: a randomized placebo-controlled study. *European Journal of Endocrinology*. 2007; 156:263–269.

**Makrigiannakis** A, Margioris AN, Chatzaki E, Zoumakis E, Chrousos GP, Gravanis A. The decidualizing effect of progesterone may involve direct transcriptional activation of corticotrophin-releasing hormone from human endometrial stromal cells. *Molecular Human Reproduction*. 1999; 5:789–796.

Malassiné A, Cronier L. Hormones and Human Trophoblast Differentiation. *Endocrine*. 2002; 19:3–12.

**Mao** X, Kikani CK, Riojas RA, Langlais P, Wang L, Ramos FJ, Fang Q, Christ-Roberts CY, Hong JY, Kim R-Y, et al. APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling and function. *Nature Cell Biology*. 2006; 8:516–523.

Maruyama T, Yoshimura Y. Molecular and Cellular Mechanisms for Differentiation and Regeneration of the Uterine Endometrium. *Endocrine Journal*. 2008; 55:795–810.

**Marwood** M, Visser K, Salamonsen LA, Dimitriadis E. Interleukin-11 and Leukemia Inhibitory Factor Regulate the Adhesion of Endometrial Epithelial Cells: Implications in Fertility Regulation. *Endocrinology*. 2009; 150:2915–2923.

Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, et al. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nature Medicine*. 1997; 3:1029–1033.

Mattern A, Zellmann T, Beck-Sickinger AG. Processing, signaling, and physiological function of chemerin. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life Journal*. 2014; 66:19–26.

**Maybin** JA, Critchley HOD. Menstrual physiology: implications for endometrial pathology and beyond. *<u>Human Reproduction</u>* <u>*Update.*</u> 2015; 21:748–761.

**Mazaki-Tovi** S, Kanety H, Pariente C, Hemi R, Wiser A, Schiff E, Sivan E. Maternal serum adiponectin levels during human pregnancy. *Journal of Perinatology*. 2007; 27:77–81.

**Mazaki-Tovi** S, Romero R, Kusanovic JP, Erez O, Vaisbuch E, Gotsch F, Mittal P, Than GN, Nhan-Chang C, Chaiworapongsa T, et al. Adiponectin multimers in maternal plasma. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*. 2008; 21:796–815.

**Mazaki-Tovi** S, Romero R, Kusanovic JP, Vaisbuch E, Erez O, Than NG, Chaiworapongsa T, Nhan-Chang C-L, Pacora P, Gotsch F, et al. Maternal visfatin concentration in normal pregnancy. *Journal of Perinatal Medicine*, 2009a; 37:206–217.

**Mazaki-Tovi** S, Romero R, Kusanovic JP, Vaisbuch E, Erez O, Than NG, Chaiworapongsa T, Nhan-Chang C-L, Pacora P, Gotsch F, et al. Visfatin in human pregnancy: maternal gestational diabetes vis-à-vis neonatal birthweight. *Journal of Perinatal Medicine*. 2009b; 37:218–231.

**Mazaki-Tovi** S, Romero R, Vaisbuch E, Kusanovic JP, Erez O, Gotsch F, Chaiworapongsa T, Than NG, Kim SK, Nhan-Chang C-L, et al. Maternal serum adiponectin multimers in preeclampsia. *Journal of Perinatal Medicine*. 2009c; 37:349–363.

McDonald EA, Wolfe MW. Adiponectin Attenuation of Endocrine Function within Human Term Trophoblast Cells. Endocrinology. 2009; 150:4358–4365.

**McDonald** EA, Wolfe MW. The pro-inflammatory role of adiponectin at the maternal-fetal interface. <u>American Journal of</u> <u>Reproductive Immunology</u>. 2011; 66:128–136.

McGee EA, Hsueh AJW. Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles 1. Endocrine Reviews. 2000; 21:200-214.

Medina EA, Oberheu K, Polusani SR, Ortega V, Velagaleti GVN, Oyajobi BO. PKA/AMPK signaling in relation to adiponectin's antiproliferative effect on multiple myeloma cells. *Leukemia*. 2014; 28:2080–2089.

Merviel P, Challier J-C, Foidart J-M. Implantation et placentation : physiologie, pathologies et traitements. 2001; Masson.

**Mimori** H, Fukuma K, Matsuo I, Nakahara K, Maeyama M. Effect of progestogen on glycogen metabolism in the endometrium of infertile patients during the menstrual cycle. *Fertility and Sterility*. 1981; 35:289–295.

Moigne A Le, Foucrier J. Biologie du développement. 2009; Dunod.

**Moindjie** H, Santos E Dos, Loeuillet L, Gronier H, Mazancourt P de, Barnea ER, Vialard F, Dieudonne M-N. Preimplantation Factor (PIF) Promotes Human Trophoblast Invasion. <u>*Biology of Reproduction*</u>. 2014; 91:1–10.

• 240 •

Mol BWJ, Roberts CT, Thangaratinam S, Magee LA, Groot CJM de, Hofmeyr GJ. Pre-eclampsia. *Lancet.* 2016; 387:999–1011.

**Moon** H-S, Chamberland JP, Aronis K, Tseleni-Balafouta S, Mantzoros CS. Direct role of adiponectin and adiponectin receptors in endometrial cancer: in vitro and ex vivo studies in humans. <u>*Molecular Cancer Therapeutics*</u>. 2011; 10:2234–2243.

**Mori** M, Ishikawa G, Luo S-S, Mishima T, Goto T, Robinson JM, Matsubara S, Takeshita T, Kataoka H, Takizawa T. The Cytotrophoblast Layer of Human Chorionic Villi Becomes Thinner but Maintains Its Structural Integrity During Gestation. *Biology of Reproduction.* 2007; 76:164–172.

**Moschen** AR, Kaser A, Enrich B, Mosheimer B, Theurl M, Niederegger H, Tilg H. Visfatin, an Adipocytokine with Proinflammatory and Immunomodulating Properties. *Journal of Immunology*. 2007; 178:1748–1758.

**Munir** I, Yen H-W, Baruth T, Tarkowski R, Azziz R, Magoffin DA, Jakimiuk AJ. Resistin Stimulation of 17α-Hydroxylase Activity in Ovarian Theca Cells in Vitro : Relevance to Polycystic Ovary Syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and* <u>Metabolism</u>. 2005; 90:4852–4857.

**Münster** K, Schmidt L, Helm P. Length and variation in the menstrual cycle--a cross-sectional study from a Danish county. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 1992; 99:422–429.

**Nacci** C, Leo V, Benedictis L De, Potenza MA, Sgarra L, Salvia MA De, Quon MJ, Montagnani M. Infliximab therapy restores adiponectin expression in perivascular adipose tissue and improves endothelial nitric oxide-mediated vasodilation in mice with type 1 diabetes. *Vascular Pharmacology*. 2016; 87:83–91.

**Nagpal** S, Patel S, Jacobe H, DiSepio D, Ghosn C, Malhotra M, Teng M, Duvic M, Chandraratna RA. Tazarotene-induced gene 2 (TIG2), a novel retinoid-responsive gene in skin. *Journal of Investigative Dermatology*. 1997; 109:91–95.

Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T, Tomita M. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *Journal of Biochemistry*. 1996; 120:803–812.

Nawrocki AR, Rajala MW, Tomas E, Pajvani UB, Saha AK, Trumbauer ME, Pang Z, Chen AS, Ruderman NB, Chen H, et al. Mice Lacking Adiponectin Show Decreased Hepatic Insulin Sensitivity and Reduced Responsiveness to Peroxisome Proliferator-activated Receptor Alpha Agonists. *Journal of Biological Chemistry*. 2005; 281:2654–2660.

Naylor C, Petri WA. Leptin Regulation of Immune Responses. *Trends in Molecular Medicine*. 2016; 22:88–98.

Négrel R. Prostacyclin as a critical prostanoid in adipogenesis. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids Journal*. 1999; 60:383–386.

Ng RC-L, Chan K-H. Potential Neuroprotective Effects of Adiponectin in Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Science*. 2017; 18:1–13.

Nien JK, Mazaki-Tovi S, Romero R, Erez O, Kusanovic JP, Gotsch F, Pineles BL, Gomez R, Edwin S, Mazor M, et al. Adiponectin in severe preeclampsia. *Journal of Perinatal Medicine*. 2007; 35:503–512.

**Nieva-Vazquez** A, Pérez-Fuentes R, Torres-Rasgado E, López-López JG, Romero JR. Serum resistin levels are associated with adiposity and insulin sensitivity in obese Hispanic subjects. <u>*Metabolic Syndrome and Related Disorders.*</u> 2014; 12:143–148.

**Nilsson** L, Binart N, Bohlooly-Y M, Bramnert M, Egecioglu E, Kindblom J, Kelly PA, Kopchick JJ, Ormandy CJ, Ling C, et al. Prolactin and growth hormone regulate adiponectin secretion and receptor expression in adipose tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005; 331:1120–1126.

Nishizawa H, Shimomura I, Kishida K, Maeda N, Kuriyama H, Nagaretani H, Matsuda M, Kondo H, Furuyama N, Kihara S, et al. Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. *Diabetes*. 2002; 51:2734–2741.

Nissi R, Talvensaari-Mattila A, Kotila V, Niinimäki M, Järvelä I, Turpeenniemi-Hujanen T, Staun-Ram E, Goldman S, Gabarin D, Shalev E, et al. Circulating matrix metalloproteinase MMP-9 and MMP-2/TIMP-2 complex are associated with spontaneous early pregnancy failure. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2013; 11:2.

**Nordengren** J, Pilka R, Noskova V, Ehinger A, Domanski H, Andersson C, Høyer-Hansen G, Hansson SR, Casslén B. Differential localization and expression of urokinase plasminogen activator (uPA), its receptor (uPAR), and its inhibitor (PAI-1) mRNA and protein in endometrial tissue during the menstrual cycle. *Molecular Human Reproduction*. 2004; 10:655–663.

Nulsen JCLM, Luciano AA, Metzger DA, Factor-Litvak P, Steinkampf MP, Giudice LC, Medicine PC of the AS for R. Endometriosis and infertility: a committee opinion. *Fertility and Sterility*. 2012; 98:591–598.

**O'Shea** T, Murdoch B. Activity of enzymes of glycogen metabolism in the reproductive tract of the ewe at mating and during early pregnancy. *Australian Journal of Biological Sciences*. 1978; 4:355–362.

Ober WB, Bernstein J. Observations on the endometrium and ovary in the newborn. *Pediatrics*. 1955; 16:445-460.

**Okada-Iwabu** M, Yamauchi T, Iwabu M, Honma T, Hamagami K, Matsuda K, Yamaguchi M, Tanabe H, Kimura-Someya T, Shirouzu M, et al. A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. *Nature*. 2013; 503:493–499.

**Okamoto** M, Ohara-Imaizumi M, Kubota N, Hashimoto S, Eto K, Kanno T, Kubota T, Wakui M, Nagai R, Noda M, et al. Adiponectin induces insulin secretion in vitro and in vivo at a low glucose concentration. *Diabetologia*. 2008; 51:827–835.

**Okamoto** Y, Kihara S, Ouchi N, Nishida M, Arita Y, Kumada M, Ohashi K, Sakai N, Shimomura I, Kobayashi H, et al. Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2002; 106:2767–2770.

**Ong** KL, Li M, Tso AWK, Xu A, Cherny SS, Sham PC, Tse HF, Lam TH, Cheung BMY, Lam KSL, et al. Association of genetic variants in the adiponectin gene with adiponectin level and hypertension in Hong Kong Chinese. *European Journal of Endocrinology*. 2010; 163:251–257.

Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. Cell Signalling. 2000; 12:1–13.

Oratz S. The hormones of the placenta. American Journal of Obstetrics and Gynecology. 2014; 6:35-41.

**Otsuka** F, Kojima S, Maruyoshi H, Kojima S, Matsuzawa Y, Funahashi T, Kaikita K, Sugiyama S, Kimura K, Umemura S, et al. Smoking cessation is associated with increased plasma adiponectin levels in men. *Journal of Cardiology*. 2009; 53:219–225.

**Ouchi** N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Muraguchi M, et al. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation*. 2000; 102:1296–1301.

**Ouchi** N, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, Nishida M, Kumada M, Okamoto Y, Ohashi K, Nagaretani H, Kishida K, et al. Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue. <u>*Circulation*</u>. 2003; 107:671–674.

Ouchi N, Walsh K. Adiponectin as an anti-inflammatory factor. Clinica Chimica Acta. 2007; 380:24-30.

**Ouyang** Y, Chen H, Chen H. Reduced plasma adiponectin and elevated leptin in pre-eclampsia. *International Journal of Gynecology and Obstetrics.* 2007; 98:110–114.

**Paiva** P, Salamonsen LA, Manuelpillai U, Dimitriadis E. Interleukin 11 Inhibits Human Trophoblast Invasion Indicating a Likely Role in the Decidual Restraint of Trophoblast Invasion During Placentation1. *Biology of Reproduction*. 2009; 80:302–310.

**Pala** HG, Ozalp Y, Yener AS, Gerceklioglu G, Uysal S, Onvural A. Adiponectin levels in gestational diabetes mellitus and in pregnant women without glucose intolerance. <u>Advances in Clinical and Experimental Medicine</u>. 2015; 24:85–92.

**Paria** BC, Huet-Hudson YM, Dey SK. Blastocyst's state of activity determines the window of implantation in the receptive mouse uterus. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1993; 90:10159–10162.

Park D-W, Yang K-M. Hormonal regulation of uterine chemokines and immune cells. <u>*Clinical and Experimental Reproductive</u>* <u>*Medicine*</u> 2011; 38:179–185.</u>

**Park** H-Y, Kwon HM, Lim HJ, Hong BK, Lee JY, Park BE, Jang YS, Cho SY, Kim H-S. Potential role of leptin in angiogenesis: leptin induces endothelial cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases in vivo and in vitro. *Experimental and Molecular Medicine*. 2001; 33:95–102.

**Park** S, Koh S-E, Hur CY, Lee W-D, Lim J, Lee Y-J. Comparison of human first and third trimester placental mesenchymal stem cell. *<u>Cell Biology International</u>* 2013; 37:242–249.

**Park** SI, Shah AN, Zhang J, Gallick GE. Regulation of angiogenesis and vascular permeability by Src family kinases: opportunities for therapeutic treatment of solid tumors. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2007; 11:1207–1217.

**Patel** L, Buckels AC, Kinghorn IJ, Murdock PR, Holbrook JD, Plumpton C, Macphee CH, Smith SA. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003; 300:472–476.

**Pereira** RD, Long NE De, Wang RC, Yazdi FT, Holloway AC, Raha S. Angiogenesis in the Placenta: The Role of Reactive Oxygen Species Signaling. *BioMed Research International Journal*. 2015; 2015:1–12.

• 242 •

**Petraglia** F, Tabanelli S, Galassi MC, Garuti GC, Mancini AC, Genazzani AR, Gurpide E. Human decidua and in vitro decidualized endometrial stromal cells at term contain immunoreactive corticotropin-releasing factor (CRF) and CRF messenger ribonucleic acid. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 1992; 74:1427–1431.

**Pienkowski** C, Cartault A, Carfagna L, Ernoult P, Vial J, Lemasson F, Mandat A Le, Galinier P, Tauber M. Ovarian Cysts in Prepubertal Girls. *Endocrine Development*. 2012; 22:101–111.

Ploeg AT van der, Reuser AJ. Pompe's disease. *Lancet*. 2008; 372:1342–1353.

**Poidatz** D, Santos E Dos, Duval F, Moindjie H, Serazin V, Vialard F, Mazancourt P De, Dieudonné M-N. Involvement of estrogen-related receptor-γ and mitochondrial content in intrauterine growth restriction and preeclampsia. *Fertility and Sterility*. 2015; 104:483–490.

**Pollheimer** J, Fock V, Knöfler M. Review: The ADAM metalloproteinases: Novel regulators of trophoblast invasion. *Placenta*. 2014; 35:57–63.

**Porcile** C, Zazzo E Di, Monaco ML, D'Angelo G, Passarella D, Russo C, Costanzo A Di, Pattarozzi A, Gatti M, Bajetto A, et al. Adiponectin as Novel Regulator of Cell Proliferation in Human Glioblastoma. *Journal of Cellular Physiology*. 2014; 229:1444–1454.

**Prast** J, Saleh L, Husslein H, Sonderegger S, Helmer H, Knöfler M. Human chorionic gonadotropin stimulates trophoblast invasion through extracellularly regulated kinase and AKT signaling. *Endocrinology*. 2008; 149:979–987.

**Preston** AM, Lindsay LA, Murphy CR. Desmosomes in uterine epithelial cells decrease at the time of implantation: An ultrastructural and morphometric study. *Journal of Morphology*. 2006; 267:103–108.

**Psilopanagioti** A, Papadaki H, Kranioti EF, Alexandrides TK, Varakis JN. Expression of adiponectin and adiponectin receptors in human pituitary gland and brain. *Neuroendocrinology*. 2009; 89:38–47.

Ptak GE, Tacconi E, Czernik M, Toschi P, Modlinski JA, Loi P. Embryonic diapause is conserved across mammals. <u>PLoS</u> <u>One</u>. 2012; 7:e33027.

**Qi** L, Saberi M, Zmuda E, Wang Y, Altarejos J, Zhang X, Dentin R, Hedrick S, Bandyopadhyay G, Hai T, et al. Adipocyte CREB Promotes Insulin Resistance in Obesity. *Cell Metabolism*. 2009; 9:277–286.

Qiao L, Kinney B, Yoo HS, Lee B, Schaack J, Shao J. Adiponectin increases skeletal muscle mitochondrial biogenesis by suppressing mitogen-activated protein kinase phosphatase-1. *Diabetes*. 2012; 61:1463–1470.

**Qiao** L, Maclean PS, Schaack J, Orlicky DJ, Darimont C, Pagliassotti M, Friedman JE, Shao J. C/EBPalpha regulates human adiponectin gene transcription through an intronic enhancer. *Diabetes*. 2005; 54:1744–1754.

Qiao L, Shao J. SIRT1 Regulates Adiponectin Gene Expression through Foxo1-C/Enhancer-binding Protein Transcriptional Complex. *Journal of Biological Chemistry*. 2006; 281:39915–39924.

**Qin** X, Garibay-Tupas J, Chua PK, Cachola L, Bryant-Greenwood GD. An autocrine/paracrine role of human decidual relaxin. I. Interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) and tissue plasminogen activator. *Biology of Reproduction*. 1997; 56:800–811.

Radulescu L, Munteanu O, Popa F, Cirstoiu M. The implications and consequences of maternal obesity on fetal intrauterine growth restriction. *Journal of Medicine and Life.* 2013; 6:292–298.

**Rak** A, Mellouk N, Froment P, Dupont J. Adiponectin and resistin: potential metabolic signals affecting hypothalamo-pituitary gonadal axis in females and males of different species. *<u>Reproduction</u>*. 2017; 153:215–226.

**Ramezani-Moghadam** M, Wang J, Ho V, Iseli TJ, Alzahrani B, Xu A, Poorten D Van der, Qiao L, George J, Hebbard L. Adiponectin reduces hepatic stellate cell migration by promoting tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) secretion. *Journal of Biological Chemistry*. 2015; 290:5533–5542.

**Ramos** MP, Rueda BR, Leavis PC, Gonzalez RR. Leptin Serves as an Upstream Activator of an Obligatory Signaling Cascade in the Embryo-Implantation Process. *Endocrinology*. 2005; 146:694–701.

**Rango** U von, Krusche CA, Kertschanska S, Alfer J, Kaufmann P, Beier HM. Apoptosis of extravillous trophoblast cells limits the trophoblast invasion in uterine but not in tubal pregnancy during first trimester. *Placenta*. 2003; 24:929–940.

**Ranjzad** F, Mahmoudi T, Irani Shemirani A, Mahban A, Nikzamir A, Vahedi M, Ashrafi M, Gourabi H. A common variant in the adiponectin gene and polycystic ovary syndrome risk. *Molecular Biology Reports.* 2012; 39:2313–2319.

Raymond T. L'endomètre: Présent et avenir. 2009; John Libbey Eurotext.

Reverchon M, Ramé C, Dupont J. La chémérine. Médecine/Sciences. 2015; 31:1-6.

**Reverchon** M, Bertoldo MJ, Ramé C, Froment P, Dupont J. Chemerin (RARRES2) Decreases In Vitro Granulosa Cell Steroidogenesis and Blocks Oocyte Meiotic Progression in Bovine Species. *Biology of Reproduction*. 2014; 90:102.

**Reverchon** M, Cornuau M, Cloix L, Rame C, Guerif F, Royere D, Dupont J. Visfatin is expressed in human granulosa cells: regulation by metformin through AMPK/SIRT1 pathways and its role in steroidogenesis. *Molecular Human Reproduction*. 2013a; 19:313–326.

**Reverchon** M, Cornuau M, Ramé C, Guerif F, Royère D, Dupont J. Resistin decreases insulin-like growth factor I-induced steroid production and insulin-like growth factor I receptor signaling in human granulosa cells. *Fertility and Sterility*. 2013b; 100:247–255.e3.

**Revollo** JR, Körner A, Mills KF, Satoh A, Wang T, Garten A, Dasgupta B, Sasaki Y, Wolberger C, Townsend RR, et al. Nampt/PBEF/Visfatin Regulates Insulin Secretion in  $\beta$  Cells as a Systemic NAD Biosynthetic Enzyme. <u>*Cell Metabolism.*</u> 2007; 6:363–375.

**Rhee** JS, Saben JL, Mayer AL, Schulte MB, Asghar Z, Stephens C, Chi MM-Y, Moley KH. Diet-induced obesity impairs endometrial stromal cell decidualization: a potential role for impaired autophagy. *Human Reproduction*. 2016; 31:1315–1326.

**Richards** AA, Stephens T, Charlton HK, Jones A, Macdonald GA, Prins JB, Whitehead JP. Adiponectin Multimerization Is Dependent on Conserved Lysines in the Collagenous Domain: Evidence for Regulation of Multimerization by Alterations in Posttranslational Modifications. <u>Molecular Endocrinology</u>. 2006; 20:1673–1687.

**Richards** JS, Liu Z, Kawai T, Tabata K, Watanabe H, Suresh D, Kuo F-T, Pisarska MD, Shimada M. Adiponectin and its receptors modulate granulosa cell and cumulus cell functions, fertility, and early embryo development in the mouse and human. *Fertility and Sterility*. 2012; 98:471–491.

**Rincon** J-P del, Iida K, Gaylinn BD, McCurdy CE, Leitner JW, Barbour LA, Kopchick JJ, Friedman JE, Draznin B, Thorner MO. Growth Hormone Regulation of p85 Expression and Phosphoinositide 3-Kinase Activity in Adipose Tissue: Mechanism for Growth Hormone-Mediated Insulin Resistance. *Diabetes*. 2007; 56:1638–1646.

Robbins JR, Bakardjiev AI. Pathogens and the placental fortress. Current Opinion in Microbiology. 2012; 15:36–43.

**Robbins** JR, Zeldovich VB, Poukchanski A, Boothroyd JC, Bakardjiev AI. Tissue barriers of the human placenta to infection with Toxoplasma gondii. *Infection and Immunity*. 2012; 80:418–428.

**Robert-Gangneux** F, Murat J-B, Fricker-Hidalgo H, Brenier-Pinchart M-P, Gangneux J-P, Pelloux H. The placenta: a main role in congenital toxoplasmosis? *<u>Trends in Parasitology</u>*. 2011; 27:530–536.

Roberts JM, Escudero C. The placenta in preeclampsia. Pregnancy Hypertension. 2012; 2:72-83.

**Rochebrochard** E, Thonneau P. Paternal age and maternal age are risk factors for miscarriage; results of a multicentre European study. *Human Reproduction*. 2002. 17:1649-1656.

**Rodriguez-Pacheco** F, Martinez-Fuentes AJ, Tovar S, Pinilla L, Tena-Sempere M, Dieguez C, Castaño JP, Malagon MM. Regulation of Pituitary Cell Function by Adiponectin. <u>*Endocrinology*</u> 2007; 148:401–410.

**Roos** S, Powell TL, Jansson T. Placental mTOR links maternal nutrient availability to fetal growth. *Biochemical Society Transactions*. 2009; 37:295–298.

**Rosario** FJ, Kanai Y, Powell TL, Jansson T. Increased placental nutrient transport in a novel mouse model of maternal obesity with fetal overgrowth. *<u>Obesity</u>*. 2015; 23:1663–1670.

**Rosario** FJ, Schumacher MA, Jiang J, Kanai Y, Powell TL, Jansson T. Chronic maternal infusion of full-length adiponectin in pregnant mice down-regulates placental amino acid transporter activity and expression and decreases fetal growth. <u>Journal of Physiology</u>. 2012; 590:1495–1509.

Ross MG, Beall MH. Adult sequelae of intrauterine growth restriction. Seminars in Perinatology. 2008; 32:213-218.

Ruan H, Dong LQ. Adiponectin signaling and function in insulin target tissues. *Journal of Molecular Cell Biology*. 2016; 8:101–109.

**Rubin** D, Helwig U, Nothnagel M, Lemke N, Schreiber S, Fölsch UR, Döring F, Schrezenmeir J. Postprandial plasma adiponectin decreases after glucose and high fat meal and is independently associated with postprandial triacylglycerols but not with – 11388 promoter polymorphism. *British Journal of Nutrition*. 2008; 99:76–82.

**Ryu** J, Galan AK, Xin X, Dong F, Abdul-Ghani MA, Zhou L, Wang C, Li C, Holmes BM, Sloane LB, et al. APPL1 Potentiates Insulin Sensitivity by Facilitating the Binding of IRS1/2 to the Insulin Receptor. *Cell Reports*. 2014; 7:1227–1238.

**Saarela** T, Hiltunen M, Helisalmi S, Heinonen S, Laakso M. Adiponectin Gene Haplotype Is Associated with Preeclampsia. *Genetic Testing*. 2006; 10:35–39.

Saddi-Rosa P, Oliveira CS V, Giuffrida FMA, Reis AF. Visfatin, glucose metabolism and vascular disease: a review of evidence. *Diabetology and Metabolic Syndrome*. 2010; 2:21.

Saint-Dizier M, Chastant-Maillard S. La reproduction animale et humaine. 2014; Quae.

**Saito** T, Jones CC, Huang S, Czech MP, Pilch PF. The Interaction of Akt with APPL1 Is Required for Insulin-stimulated Glut4 Translocation. *Journal of Biological Chemistry*. 2007; 282:32280–32287.

**Salleh** N, Giribabu N. Leukemia inhibitory factor: roles in embryo implantation and in nonhormonal contraception. <u>Scientific</u> <u>World Journal</u>. 2014; 2014:201514.

**Salminen** A, Hyttinen JMT, Kaarniranta K. AMP-activated protein kinase inhibits NF-κB signaling and inflammation: impact on healthspan and lifespan. *Journal of Molecular Medicine*. 2011; 89:667–676.

**Samal** B, Sun Y, Stearns G, Xie C, Suggs S, McNiece I. Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Molecular and Cellular Biology*. 1994; 14:1431–1437.

**Sánchez-Solana** B, Laborda J, Baladrón V. Mouse Resistin Modulates Adipogenesis and Glucose Uptake in 3T3-L1 Preadipocytes Through the ROR1 Receptor. *Molecular Endocrinology.* 2012; 26:110–127.

Sandra S, Sanchez-Gomez M. IGF-II Stimulates MMP-9 and MMP-2 Activity in a Human Trophoblast Model. <u>Acta Biológica</u> <u>Colombiana</u> 1982; 16:121–132.

**Santos** E Dos, Serazin V, Morvan C, Torre A, Wainer R, Mazancourt P De, Dieudonné M-NN. Adiponectin and leptin systems in human endometrium during window of implantation. *Fertility and Sterility*. 2012; 97:771–778.

Satoh N, Naruse M, Usui T, Tagami T, Suganami T, Yamada K, Kuzuya H, Shimatsu A, Ogawa Y. Leptin-to-adiponectin ratio as a potential atherogenic index in obese type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2004; 27:2488–2490.

Saxena NK, Sharma D. Metastasis suppression by adiponectin: LKB1 rises up to the challenge. *Cell Adhesion and Migration*. 2010; 4:358–362.

Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 1995; 270:26746–26749.

**Schulz** LC, Townsend K, Kunz TH, Widmaier EP. Inhibition of trophoblast invasiveness in vitro by immunoneutralization of leptin in the bat, Myotis lucifugus (Chiroptera). *General and Comparative Endocrinology*. 2007; 150:59–65.

Schwartz N, Quant HS, Sammel MD, Parry S. Macrosomia has its roots in early placental development. *Placenta*. 2014; 35:684–690.

Scoditti E, Massaro M, Carluccio MA, Pellegrino M, Wabitsch M, Calabriso N, Storelli C, Caterina R De. Additive regulation of adiponectin expression by the mediterranean diet olive oil components oleic Acid and hydroxytyrosol in human adipocytes. *PLoS One.* 2015; 10:e0128218.

**Sebire** NJ, Fox H, Backos M, Rai R, Paterson C, Regan L. Defective endovascular trophoblast invasion in primary antiphospholipid antibody syndrome-associated early pregnancy failure. *Human Reproduction.* 2002; 17:1067–1071.

Segovia SA, Vickers MH, Gray C, Reynolds CM. Maternal obesity, inflammation, and developmental programming. *BioMed Research International*. 2014; 2014:418–475.

Séjourné N, Callahan S, Chabrol H. La fausse couche : une expérience difficile et singulière. *Devenir*. 2009; 21:143.

**Selcer** KW, Leavitt WW. Progesterone down-regulation of nuclear estrogen receptor: a fundamental mechanism in birds and mammals. *General and Comparative Endocrinology*. 1988; 72:443–452.

Señarís R, Garcia-Caballero T, Casabiell X, Gallego R, Castro R, Considine R V., Dieguez C, Casanueva FF. Synthesis of Leptin in Human Placenta. *Endocrinology.* 1997; 138:4501–4504.

Seo JB, Moon HM, Noh MJ, Lee YS, Jeong HW, Yoo EJ, Kim WS, Park J, Youn B-S, Kim JW, et al. Adipocyte Determinationand Differentiation-dependent Factor 1/Sterol Regulatory Element-binding Protein 1c Regulates Mouse Adiponectin Expression. *Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279:22108–22117. **Sepilian** V, Nagamani M. Adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome and severe insulin resistance. *Journal* of the Society for Gynecologic Investigation. 2005; 12:129–134.

Serdar Serin I, Ozçelik B, Basbug M, Ozsahin O, Yilmazsoy A, Erez R. Effects of hypertension and obesity on endometrial thickness. *European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology*. 2003; 109:72–75.

Seval Y, Cakmak H, Kayisli UA, Arici A. Estrogen-Mediated Regulation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Human Endometrium. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2006; 91:2349–2357.

Sewter C, Berger D, Considine R V, Medina G, Rochford J, Ciaraldi T, Henry R, Dohm L, Flier JS, O'Rahilly S, et al. Human obesity and type 2 diabetes are associated with alterations in SREBP1 isoform expression that are reproduced ex vivo by tumor necrosis factor-alpha. *Diabetes*. 2002; 51:1035–1041.

Shah D, Nagarajan N. Luteal insufficiency in first trimester. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2013; 17:44–49.

**Shapiro** L, Scherer PE. The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor. *Current Biology*. 1998; 8:335–338.

**Sharma** A, Kumar P. Understanding implantation window, a crucial phenomenon. *Journal of Human Reproductive Sciences*. 2012; 5:2–6.

Sharma D, Shastri S, Sharma P. Intrauterine Growth Restriction: Antenatal and Postnatal Aspects. <u>*Clinical Medicine Insights.*</u> 2016; 10:67–83.

Sharp AN, Heazell AEP, Crocker IP, Mor G. Placental apoptosis in health and disease. <u>American Journal of Reproductive</u> <u>Immunology</u>. 2010; 64:159–169.

**Shen** C-J, Tsai E-M, Lee J-N, Chen Y-L, Lee C-H, Chan T-F. The concentrations of visfatin in the follicular fluids of women undergoing controlled ovarian stimulation are correlated to the number of oocytes retrieved. *Fertility and Sterility*. 2010; 93:1844–1850.

Shimomura I, Funahashi T, Takahashi M, Maeda K, Kotani K, Nakamura T, Yamashita S, Miura M, Fukuda Y, Takemura K, et al. Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat: possible contributor to vascular disease in obesity. *Nature Medecine*. 1996; 2:800–803.

Sierksma A, Patel H, Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Heine RJ, Grobbee DE, Kluft C, Hendriks HFJ. Effect of moderate alcohol consumption on adiponectin, tumor necrosis factor-alpha, and insulin sensitivity. *Diabetes Care*. 2004; 27:184–189.

Silasi M, Cardenas I, Kwon J-Y, Racicot K, Aldo P, Mor G. Viral infections during pregnancy. <u>American Journal of</u> <u>Reproductive Immunology</u>. 2015; 73:199–213.

**Silswal** N, Singh AK, Aruna B, Mukhopadhyay S, Ghosh S, Ehtesham NZ. Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-12 in macrophages by NF- $\kappa$ B-dependent pathway. <u>*Biochemical and Biophysical Research Communications*</u>. 2005; 334:1092–1101.

**Silva** R de CP da C e, Moura KKV de O, Ribeiro Júnior CL, Guillo LA, Silva R de CP da C e, Moura KKV de O, Ribeiro Júnior CL, Guillo LA. Estrogen signaling in the proliferative endometrium: implications in endometriosis. <u>*Revista da*</u> <u>Associação Médica Brasileira</u>. 2016; 62:72–77.

Simón C, Moreno C, Remohí J, Pellicer A. Molecular interactions between embryo and uterus in the adhesion phase of human implantation. *Human Reproduction*. 1998; 13:219–236.

Simone N Di, Nicuolo F Di, Marzioni D, Castellucci M, Sanguinetti M, D'Ippolito S, Caruso A. Resistin modulates glucose uptake and glucose transporter-1 (GLUT-1) expression in trophoblast cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2009; 13:388–397.

Singh H, Aplin JD. Adhesion molecules in endometrial epithelium: tissue integrity and embryo implantation. *Journal of* <u>Anatomy</u>. 2009; 215:3–13.

Siti Norashikin MT, Ghosh S, Chatterjee R, Rajikin MH, Chatterjee A. Nicotine and endometrial decidual growth in pseudopregnant rats. *Reproductive Medicine and Biology*. 2014; 13:135–141.

Smith MM, Minson CT. Obesity and adipokines: effects on sympathetic overactivity. *Journal of Physiology*. 2012; 590:1787–1801.

**Spicer** LJ, Francisco CC. Adipose obese gene product, leptin, inhibits bovine ovarian thecal cell steroidogenesis. <u>*Biology of Reproduction.*</u> 1998; 58:207–212.

**Staun-Ram** E, Goldman S, Gabarin D, Shalev E. Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2004; 2:59–72.

**Staun-Ram** E, Shalev E. Human trophoblast function during the implantation process. <u>*Reproductive Biology and Endocrinology*</u>. 2005; 3:56–60.

**Steeg** JW van der, Steures P, Eijkemans MJC, Habbema JDF, Hompes PGA, Burggraaff JM, Oosterhuis GJE, Bossuyt PMM, Veen F van der, Mol BWJ. Obesity affects spontaneous pregnancy chances in subfertile, ovulatory women. <u>Human</u> <u>Reproduction</u>. 2007; 23:324–328.

**Stefanoska** I, Jovanović Krivokuća M, Vasilijić S, Ćujić D, Vićovac L. Prolactin stimulates cell migration and invasion by human trophoblast in vitro. *Placenta*. 2013; 34:775–783.

Stoll BA. Western diet, early puberty, and breast cancer risk. *Breast Cancer Research and Treatment*, 1998; 49:187–193.

**Straszewski-Chavez** SL, Abrahams VM, Mor G. The role of apoptosis in the regulation of trophoblast survival and differentiation during pregnancy. *Endocrine Reviews*. 2005; 26:877–897.

Strauss JF, Jerome F, Barbieri RL, Yen SSC. Reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology, and clinical management. 2014; Elsevier.

**Strowitzki** T, Capp E, Wolff M von, Müller-Höcker J. Expression of glucose transporter 1 in human endometrial and decidual tissue. *Gynecological Endocrinology*. 2001; 15:219–224.

Sumner-Thomson JM, Vierck JL, McNamara JP. Differential expression of genes in adipose tissue of first-lactation dairy cattle1. *Journal of Dairy Science*. 2011; 94:361–369.

Sun Y, Zang Z, Zhong L, Wu M, Su Q, Gao X, Zan W, Lin D, Zhao Y, Zhang Z. Identification of adiponectin receptor agonist utilizing a fluorescence polarization based high throughput assay. *PLoS One* 2013; 8:e63354.

**Sundbom** M, Kaiser C, Björkstrand E, Castro VM, Larsson C, Selén G, Nyhem C, James SR. Inhibition of 11βHSD1 with the S-phenylethylaminothiazolone BVT116429 increases adiponectin concentrations and improves glucose homeostasis in diabetic KKAy mice. *BioMed Central Pharmacology*. 2008; 8:3.

Suwaki N, Masuyama H, Nakatsukasa H, Masumoto A, Sumida Y, Takamoto N, Hiramatrsu Y. Hypoadiponectinemia and circulating angiogenic factors in overweight patients complicated with pre-eclampsia. <u>American Journal of Obstetrics &</u> <u>Gynecology</u>. 2006; 195:1687–1692.

Swarbrick MM, Havel PJ. Physiological, Pharmacological, and Nutritional Regulation of Circulating Adiponectin Concentrations in Humans. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*. 2008; 6:87.

Szekeres-Bartho J, Halasz M, Palkovics T. Progesterone in pregnancy; receptor–ligand interaction and signaling pathways. *Journal of Reproductive Immunology*. 2009; 83:60-64.

**Takahashi** M, Arita Y, Yamagata K, Matsukawa Y, Okutomi K, Horie M, Shimomura I, Hotta K, Kuriyama H, Kihara S, et al. Genomic structure and mutations in adipose-specific gene, adiponectin. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*. 2000; 24:861–868.

**Takahashi** Y, Takahashi M, Carpino N, Jou S-T, Chao J-R, Tanaka S, Shigeyoshi Y, Parganas E, Ihle JN. Leukemia Inhibitory Factor Regulates Trophoblast Giant Cell Differentiation via Janus Kinase 1-Signal Transducer and Activator of Transcription 3-Suppressor of Cytokine Signaling 3 Pathway. *Molecular Endocrinology*. 2008; 22:1673–1681.

**Takemura** Y, Osuga Y, Harada M, Hirata T, Koga K, Morimoto C, Hirota Y, Yoshino O, Yano T, Taketani Y. Serum adiponectin concentrations are decreased in women with endometriosis. *Human Reproduction.* 2005; 20:3510–3513.

**Takemura** Y, Osuga Y, Yamauchi T, Kobayashi M, Harada M, Hirata T, Morimoto C, Hirota Y, Yoshino O, Koga K, et al. Expression of adiponectin receptors and its possible implication in the human endometrium. *Endocrinology*. 2006; 147:3203–3210.

Tan BK, Brosens JJ. Pregnancy Endocrinology. 2015; BioMed Science.

**Tanabe** H, Fujii Y, Okada-Iwabu M, Iwabu M, Nakamura Y, Hosaka T, Motoyama K, Ikeda M, Wakiyama M, Terada T, et al. Crystal structures of the human adiponectin receptors. *Nature*. 2015; 520:312–316.

**Tanaka** T, Utsunomiya T, Bai T, Nakajima S, Umesaki N. Leptin inhibits decidualization and enhances cell viability of normal human endometrial stromal cells. *International Journal of Molecular Medicine* 2003; 12:95–98.

**Tapia-Pizarro** A, Argandoña F, Palomino WA, Devoto L. Human chorionic gonadotropin (hCG) modulation of TIMP1 secretion by human endometrial stromal cells facilitates extravillous trophoblast invasion in vitro. *Human Reproduction*. 2013; 28:2215–2227.

**Tartaglia** LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. <u>*Cell*</u>. 1995; 83:1263–1271.

**Teklenburg** G, Salker M, Molokhia M, Lavery S, Trew G, Aojanepong T, Mardon HJ, Lokugamage AU, Rai R, Landles C, et al. Natural selection of human embryos: decidualizing endometrial stromal cells serve as sensors of embryo quality upon implantation. *PLoS One*, 2010; 5:e10258.

**Telgmann** R, Gellersen B. Marker genes of decidualization: activation of the decidual prolactin gene. <u>*Human Reproduction*</u> <u>*Update.*</u> 1998; 4:472–479.

**Telgmann** R, Maronde E, Task?n K, Gellersen B. Activated Protein Kinase A Is Required for Differentiation-Dependent Transcription of the Decidual Prolactin Gene in Human Endometrial Stromal Cells 1. *Endocrinology*. 1997; 138:929–937.

**Timeva** T, Shterev A, Kyurkchiev S. Recurrent implantation failure: the role of the endometrium. *Journal of Reproduction and Infertility*. 2014; 15:173–183.

Tomac J, Cekinovć D, Arapović J. Biology of the corpus luteum. *Periodicum Biologorum*. 2011; 113:43–49.

**Tomas** E, Tsao T-S, Saha AK, Murrey HE, Zhang C c., Itani SI, Lodish HF, Ruderman NB. Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: Acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002; 99:16309–16313.

**Tomita** K, McCoshen JA, Fernandez CS, Tyson JE. Immunologic and biologic characteristics of human decidual prolactin. <u>American Journal of Obstetrics and Gynecology</u>. 1982; 142:420–426.

Trévoux R. L'endometre Present et Avenir. 2009; John Libbey.

**Tsai** P-JS, Davis J, Bryant-Greenwood G. Systemic and placental leptin and its receptors in pregnancies associated with obesity. *<u>Reproductive Sciences</u>*. 2015; 22:189–197.

**Tsampalas** M, Gridelet V, Berndt S, Foidart J-M, Geenen V, Perrier d'Hauterive S. Human chorionic gonadotropin: a hormone with immunological and angiogenic properties. *Journal of Reproductive Immunology.* 2010; 85:93–98.

**Tseng** J-J, Chou M-M. Differential Expression of Growth-, Angiogenesis- and Invasion-Related Factors in The Development of Placenta Accreta. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2006; 45:100–106.

Tuckey RC. Progesterone synthesis by the human placenta. *Placenta*. 2005; 26:273–281.

**Turner** CT, Fuller M, Hopwood JJ, Meikle PJ, Brooks DA. Glycogen Exocytosis from Cultured Pompe Skin Fibroblasts. *<u>Translational Biomedicine</u>*. 2015; 6:2–17.

Uhbeck GF. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochemical Journal*. 2006; 393:7–20.

Uzan J, Carbonnel M, Piconne O, Asmar R, Ayoubi J-M. Pre-eclampsia: pathophysiology, diagnosis, and management. *Vascular Health and Risk Management*. 2011; 7:467–474.

Vanhaesebroeck B, Stephens L, Hawkins P. PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2012; 13:195–203.

Vanvoorhis B, Dawson J, Stovall D, Sparks A, Syrop C. The effects of smoking on ovarian function and fertility during assisted reproduction cycles. *Obstetrics and Gynecology*. 1996; 88:785–791.

**Vargas** M, Vargas E, Julian CG, Armaza JF, Rodriguez A, Tellez W, Niermeyer S, Wilson M, Parra E, Shriver M, et al. Determinants of blood oxygenation during pregnancy in Andean and European residents of high altitude. <u>*American Journal of Physiology*</u>. 2007; 293:1303–1312.

Velicky P, Knöfler M, Pollheimer J. Function and control of human invasive trophoblast subtypes: Intrinsic vs. maternal control. *Cell Adhesion and Migration*. 2016; 10:154–162.

Vercellini P, Vercellini P, Viganò P, Somigliana E, Fedele L. Endometriosis: pathogenesis and treatment. *Nature Publishing Group.* 2013;10:261–275.

Villarreal-Molina MTT, Antuna-Puente B. Adiponectin: Anti-inflammatory and cardioprotective effects. *Biochimie*. 2012; 94:2143–2149.

• 248 •

**Vinketova** K, Mourdjeva M, Oreshkova T. Human Decidual Stromal Cells as a Component of the Implantation Niche and a Modulator of Maternal Immunity. *Journal of Pregnancy.* 2016; 2016:868–943.

**Vionnet** N, Hani EH, Dupont S, Gallina S, Francke S, Dotte S, Matos F De, Durand E, Leprêtre F, Lecoeur C, et al. Genomewide Search for Type 2 Diabetes–Susceptibility Genes in French Whites: Evidence for a Novel Susceptibility Locus for Early-Onset Diabetes on Chromosome 3q27-qter and Independent Replication of a Type 2–Diabetes Locus on Chromosome 1q21–q24. *American Journal of Human Genetics*. 2000; 67:1470–1480.

**Visentin** S, Lapolla A, Londero A Pietro, Cosma C, Dalfrà M, Camerin M, Faggian D, Plebani M, Cosmi E, Cosmi E. Adiponectin levels are reduced while markers of systemic inflammation and aortic remodelling are increased in intrauterine growth restricted mother-child couple. *BioMed Research International*. 2014; 14:401–595.

**Vogel** P. The current molecular phylogeny of Eutherian mammals challenges previous interpretations of placental evolution. *Placenta*. 2005; 26:591–596.

**Vural** F, Vural B, Çakıroğlu Y. The Role of Overweight and Obesity in In Vitro Fertilization Outcomes of Poor Ovarian Responders. *BioMed Research International*. 2015; 15:781–843.

**Waki** H, Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Uchida S, Kita S, Hara K, Hada Y, Vasseur F, Froguel P, et al. Impaired Multimerization of Human Adiponectin Mutants Associated with Diabetes: Molecular structure and multimers formations of adiponectin. *Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278:352–363.

**Waki** H, Yamauchi T, Kamon J, Kita S, Ito Y, Hada Y, Uchida S, Tsuchida A, Takekawa S, Kadowaki T. Generation of Globular Fragment of Adiponectin by Leukocyte Elastase Secreted by Monocytic Cell Line THP-1. <u>*Endocrinology*</u>. 2005; 146:790–796.

**Wang** C, Xin X, Xiang R, Ramos FJ, Liu M, Lee HJ, Chen H, Mao X, Kikani CK, Liu F, et al. Yin-Yang regulation of adiponectin signaling by APPL isoforms in muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2009; 284:31608–31615.

Wang H, Cheng H, Shao Q, Dong Z, Xie Q, Zhao L, Wang Q, Kong B, Qu X. Leptin-Promoted Human Extravillous Trophoblast Invasion Is MMP14 Dependent and Requires the Cross Talk Between Notch1 and PI3K/Akt Signaling1. *Biology* of *Reproduction*. 2014; 90:78.

Wang Q, Leader A, Tsang BK. Inhibitory Roles of Prohibitin and Chemerin in FSH-Induced Rat Granulosa Cell Steroidogenesis. *Endocrinology*. 2013; 154:956–967.

**Wang** Y, Lam KSL, Chan L, Chan KW, Lam JBB, Lam MC, Hoo RCL, Mak WWN, Cooper GJS, Xu A. Post-translational modifications of the four conserved lysine residues within the collagenous domain of adiponectin are required for the formation of its high molecular weight oligomeric complex. *Journal of Biological Chemistry*. 2006; 281:16391–16400.

**Wang** Y, Lam KSL, Yau M, Xu A. Post-translational modifications of adiponectin: mechanisms and functional implications. *Biochemical Journal*. 2008; 409:623–633.

Warwick D. Uteroplacental Blood Flow. 2015; Anesthesiology.

Wassarman P, Chen J, Cohen N, Litscher E, Liu C, Qi H, Williams Z. Structure and function of the mammalian egg zona pellucida. *Journal of Experimental Zoology*. 1999; 285:251–258.

Webster WS, Abela D. The effect of hypoxia in development. Birth Defects Research. 2007; 81:215-228.

**Wedellova** Z, Kovacova Z, Tencerova M, Vedral T, Rossmeislova L, Siklova-Vitkova M, Stich V, Polak J. The Impact of Full-Length, Trimeric and Globular Adiponectin on Lipolysis in Subcutaneous and Visceral Adipocytes of Obese and Non-Obese Women. <u>*PLoS One*</u>. 2013; 8:e66783.

**Weigel** MT, Krämer J, Schem C, Wenners A, Alkatout I, Jonat W, Maass N, Mundhenke C. Differential expression of MMP-2, MMP-9 and PCNA in endometriosis and endometrial carcinoma. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*. 2012; 160:74–78.

Weimar CHE, Kavelaars A, Brosens JJ, Gellersen B, Vreeden-Elbertse JMT de, Heijnen CJ, Macklon NS. Endometrial Stromal Cells of Women with Recurrent Miscarriage Fail to Discriminate between High- and Low-Quality Human Embryos. In Lambalk CB, editor. *PLoS One*. 2012; 7:e41424.

Weiss G, Goldsmith LT. Mechanisms of Relaxin-Mediated Premature Birth. <u>Annals of the New York Academy of Sciences</u>. 2005; 1041:345–350.

Weiss G, Sundl M, Glasner A, Huppertz B, Moser G. The trophoblast plug during early pregnancy: a deeper insight. *Histochemistry and Cell Biology*. 2016; 146:749–756.

**Wen** J-P, Liu C, Bi W-K, Hu Y-T, Chen Q, Huang H, Liang J-X, Li L-T, Lin L-X, Chen G. Adiponectin inhibits KISS1 gene transcription through AMPK and specificity protein-1 in the hypothalamic GT1-7 neurons. *Journal of Endocrinology*. 2012; 214:177–189.

Weng Y-H, Yang C-Y, Chiu Y-W. Risk Assessment of Adverse Birth Outcomes in Relation to Maternal Age. In Rogers LK, editor. *PLoS One*. 2014; 9:e114843.

**Wetendorf** M, DeMayo FJ. The progesterone receptor regulates implantation, decidualization, and glandular development via a complex paracrine signaling network. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2012; 357:108–118.

Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA. Hypoadiponectinemia in Obesity and Type 2 Diabetes: Close Association with Insulin Resistance and Hyperinsulinemia. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2001; 86:1930–1935.

Whitley GSJ, Cartwright JE. Cellular and molecular regulation of spiral artery remodelling: lessons from the cardiovascular field. Placenta 2010; 31:465–474.

**Wijesekara** N, Krishnamurthy M, Bhattacharjee A, Suhail A, Sweeney G, Wheeler MB. Adiponectin-induced ERK and Akt Phosphorylation Protects against Pancreatic Beta Cell Apoptosis and Increases Insulin Gene Expression and Secretion. *Journal of Biological Chemistry*. 2010; 285:33623–33631.

Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR. Time of Implantation of the Conceptus and Loss of Pregnancy. <u>New England Journal of</u> <u>Medicine</u>, 1999; 340:1796–1799.

Wise LA, Rothman KJ, Mikkelsen EM, Sørensen HT, Riis A, Hatch EE. An internet-based prospective study of body size and time-to-pregnancy. *Human Reproduction*. 2010; 25:253–264.

Wittamer V, Bondue B, Guillabert A, Vassart G, Parmentier M, Communi D. Neutrophil-Mediated Maturation of Chemerin: A Link between Innate and Adaptive Immunity. *Journal of Immunology*. 2005; 175:487–493.

**Wittamer** V, Franssen J-D, Vulcano M, Mirjolet J-F, Poul E Le, Migeotte I, Brézillon S, Tyldesley R, Blanpain C, Detheux M, et al. Specific Recruitment of Antigen-presenting Cells by Chemerin, a Novel Processed Ligand from Human Inflammatory Fluids. *Journal of Experimental Medicine*. 2003; 198:977–985.

**Wolf** AM, Wolf D, Rumpold H, Enrich B, Tilg H. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004; 323:630–635.

**Wu** H-M, Huang H-Y, Lee C-L, Soong Y-K, Leung PCK, Wang H-S. Gonadotropin-Releasing Hormone Type II (GnRH-II) Agonist Regulates the Motility of Human Decidual Endometrial Stromal Cells: Possible Effect on Embryo Implantation and Pregnancy1. *Biology of Reproduction*. 2015; 92:98.

**Wu** J, Yan W-J, Mo J, Yang H-B, Wang Z-Z, Lei M-X, Peng L-W. Association of adiponectin gene polymorphism with obesity in children. *Chinese Journal of Contemporary Pediatrics*. 2011; 13:539–542.

**Wulster-Radcliffe** MC, Ajuwon KM, Wang J, Christian JA, Spurlock ME. Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004; 316:924–929.

Xin X, Zhou L, Reyes CM, Liu F, Dong LQ. APPL1 mediates adiponectin-stimulated p38 MAPK activation by scaffolding the TAK1-MKK3-p38 MAPK pathway. *American Journal of Physiology*. 2010; 300:103–110.

Xu A, Chan KW, Hoo RLC, Wang Y, Tan KCB, Zhang J, Chen B, Lam MC, Tse C, Cooper GJS, et al. Testosterone selectively reduces the high molecular weight form of adiponectin by inhibiting its secretion from adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280:18073–18080.

Xu J, Lu C, Wang J, Zhang R, Qian X, Zhu H. Regulation of Human Trophoblast GLUT3 Glucose Transporter by Mammalian Target of Rapamycin Signaling. *International Journal of Molecular Science*. 2015; 16:13815–13828.

**Yamamoto** S, Matsushita Y, Nakagawa T, Hayashi T, Noda M, Mizoue T. Circulating adiponectin levels and risk of type 2 diabetes in the Japanese. *<u>Nutrition and Diabetes</u>*. 2014; 4:e130.

**Yamamoto** Y, Hirose H, Miyashita K, Nishikai K, Saito I, Taniyama M, Tomita M, Saruta T. PPAR(gamma)2 gene Pro12Ala polymorphism may influence serum level of an adipocyte-derived protein, adiponectin, in the Japanese population. <u>*Metabolism*</u>. 2002; 51:1407–1409.

Yamauchi T, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Kadowaki T. Adiponectin receptors: A review of their structure, function and how they work. *Best Practice and Research*. 2014; 28:15–23.

Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*. 2003; 423:762–769.

Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature Medecine*. 2002; 8:1288–1295.

**Yamauchi** T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. <u>Nature</u> <u>Medecine</u>. 2001; 7:941–946.

Yang M, Lei ZM, Rao C V. The Central Role of Human Chorionic Gonadotropin in the Formation of Human Placental Syncytium. *Endocrinology*. 2003; 144:1108–1120.

Yanning Wang. TNF-alpha Inhibition of Adiponectin Expression by Targeting PPAR-gamma and C/EBP in Adipocytes. 2009; LSU Digital.

Ye Y, Kawamura K, Sasaki M, Kawamura N, Groenen P, Sollewijn Gelpke MD, Kumagai J, Fukuda J, Tanaka T. Leptin and ObRa/MEK signalling in mouse oocyte maturation and preimplantation embryo development. <u>*Reproductive BioMedicine Online*</u>. 2009; 19:181–190.

**Yki-Järvinen** H, Wahlström T, Seppälä M. Human endometrium contains relaxin that is progesterone-dependent. Acta *Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*. 1985; 64:663–665.

**Yokota** T, Oritani K, Takahashi I, Ishikawa J, Matsuyama A, Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Tenner AJ, Tomiyama Y, et al. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. <u>*Blood.*</u> 2000; 96:1723–1732.

**Yoon** MJ, Lee GY, Chung J-J, Ahn YH, Hong SH, Kim JB. Adiponectin Increases Fatty Acid Oxidation in Skeletal Muscle Cells by Sequential Activation of AMP-Activated Protein Kinase, p38 Mitogen-Activated Protein Kinase, and Peroxisome Proliferator–Activated Receptor α. *Diabetes*. 2006; 55:2562–2570.

**Youpeng** B, Wei X, Wei L, Jin J, Haiyan Y, Yuan Y, Rong Z. Relationships among adiponectin gene polymorphisms, proteinuria and increased blood pressure in the context of placental diseases. *Hypertension Research*. 2010; 33:1066–1070.

**Yu** J, Wu J, Bagchi IC, Bagchi MK, Sidell N, Taylor RN. Disruption of gap junctions reduces biomarkers of decidualization and angiogenesis and increases inflammatory mediators in human endometrial stromal cell cultures. <u>*Molecular and Cellular Endocrinology*</u>. 2011; 344:25–34.

Yuan G, Chen X, Ma Q, Qiao J, Li R, Li X, Li S, Tang J, Zhou L, Song H, et al. C-reactive protein inhibits adiponectin gene expression and secretion in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Endocrinology*. 2007; 194:275–281.

Yuan H-P, Sun L, Li X-H, Che F-G, Zhu X-Q, Yang F, Han J, Jia C-Y, Yang Z. Association of Adiponectin Polymorphism with Metabolic Syndrome Risk and Adiponectin Level with Stroke Risk: A Meta-Analysis. *Science Reports.* 2016; 6:31–45.

**Zachow** RJ, Magoffin DA. Direct Intraovarian Effects of Leptin: Impairment of the Synergistic Action of Insulin-Like Growth Factor-I on Follicle-Stimulating Hormone-Dependent Estradiol-17β Production by Rat Ovarian Granulosa Cells. *Endocrinology*. 1997; 138:847–850.

Zakiyah N, Postma MJ, Baker PN, Asselt ADI van, IMPROVED Consortium O behalf of the Impro. Pre-eclampsia Diagnosis and Treatment Options: A Review of Published Economic Assessments. *Pharmacoeconomics.* 2015; 33:1069–1082.

**Zappalà** G, Rechler MM. IGFBP-3, hypoxia and TNF-α inhibit adiponectin transcription. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009; 382:785–789.

**Zechner** R, Moser R, Newman TC, Fried SK, Breslow JL. Apolipoprotein E gene expression in mouse 3T3-L1 adipocytes and human adipose tissue and its regulation by differentiation and lipid content. *Journal of Biological Chemistry*. 1991; 266:10583–10588.

**Zhang** J, Chen Z, Graeme NS, Croy AB. Natural killer cell-triggered vascular transformation: maternal care before birth? <u>*Cellular and Molecular Immunology*</u>. 2001; 8:1-11.

**Zhang** S, Lin H, Kong S, Wang S, Wang HH, Wang HH, Armant DR. Physiological and molecular determinants of embryo implantation. *Molecular Aspects of Medicine*. 2013a; 34:939–980.

**Zhang** X-H, Liang X, Liang X-H, Wang T-S, Qi Q-R, Deng W-B, Sha A-G, Yang Z-M. The mesenchymal-epithelial transition during in vitro decidualization. *<u>Reproductive Sciences</u>*. 2013b; 20:354–360.

**Zhang** Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994; 372:425–432.

**Zheng** Q, Dai K, Cui X, Yu M, Yang X, Yan B, Liu S, Yan Q. Leukemia inhibitory factor promote trophoblast invasion via urokinase-type plasminogen activator receptor in preeclampsia. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2016; 80:102–108.

**Zhu** H, Leung PCK, MacCalman CD. Expression of ADAMTS-5/implantin in human decidual stromal cells: regulatory effects of cytokines. *Human Reproduction*. 2006; 22:63–74.

Zhu J-Y, Pang Z-J, Yu Y-H. Regulation of trophoblast invasion: the role of matrix metalloproteinases. <u>*Reviews in Obstetrics*</u> <u>and Gynecology</u>. 2012; 5:e137-43.

**Zhuo** Q, Wang Z, Fu P, Piao J, Tian Y, Xu J, Yang X. Comparison of adiponectin, leptin and leptin to adiponectin ratio as diagnostic marker for metabolic syndrome in older adults of Chinese major cities. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2009; 84:27–33.

# PUBLICATIONS ANNEXES

## FONCTION MITOCHONDRIALE ET GROSSESSES PATHOLOGIQUES

# ETUDE DE LA BIOGÉNÈSE MITOCHONDRIALE ET DU CONTENU MITOCHONDRIAL DANS DES PLACENTAS PATHOLOGIQUES

## Article 5

# Involvement of estrogen-related receptor- $\gamma$ (ERR $\gamma$ ) and mitochondrial content in intrauterine growth restriction and preeclampsia

Dorothée Poidatz, Esther Dos Santos, **Fabien Duval**, Hadia Moindjie, Valérie Serazin, François Vialard, Philippe de Mazancourt, Marie-Noëlle Dieudonné

FERTILITY AND STERILITY (2015)



# Involvement of estrogen-related receptor- $\gamma$ and mitochondrial content in intrauterine growth restriction and preeclampsia

Dorothée Poidatz, Ph.D.,<sup>a</sup> Esther Dos Santos, Ph.D.,<sup>a,b</sup> Fabien Duval, B.S.,<sup>a</sup> Hadia Moindjie, B.S.,<sup>a</sup> Valérie Serazin, M.D., Ph.D.,<sup>a,b</sup> François Vialard, M.D., Ph.D.,<sup>a,c</sup> Philippe De Mazancourt, M.D., Ph.D.,<sup>a,d</sup> and Marie-Noëlle Dieudonné, Ph.D.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Unité de Pathologie Cellulaire et Génétique - Equipe d'Accueil 2493, Université de Versailles-St. Quentin, Unité de Formation et de Recherche des Sciences de la Santé, Montigny le Bretonneux; <sup>b</sup> Service de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Intercommunal (CHI) de Poissy-St-Germain, Poissy; <sup>c</sup> Département de Biologie de la Reproduction, Cytogénétique, Gynécologie et Obstétrique, CHI de Poissy-St-Germain, Poissy; and <sup>d</sup> Service de Biochimie et Génétique Moléculaire, Hôpital A. Paré, Boulogne, France

**Objective:** To measure mitochondrial content and the expression of estrogen-related receptor- $\gamma$  (ERR $\gamma$ , a major inducer of mitochondrial biogenesis) in placentas from women with intrauterine growth restriction (IUGR) associated or not with preeclampsia (PE), relative to control placentas.

Design: Case-control study.

**Setting:** Teaching hospital and university research laboratory.

Patient(s): Thirty-nine placentas from women with IUGR, 8 IUGR+PE, and 30 controls.

Intervention(s): None.

Main Outcome Measure(s): Mitochondrial DNA and protein content, gene and protein expression.

**Result(s):** We observed significantly lower placental mitochondrial DNA and protein contents (associated with down-regulation of ERR $\gamma$  expression) in IUGR and IUGR+PE placentas, relative to control placentas. Our results also revealed that the placental mitochondrial DNA content was directly correlated with fetal weight. Moreover, we observed significantly lower peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  and sirtuin 1 messenger RNA expression levels in IUGR+PE placentas, relative to control placentas.

**Conclusion(s):** The low mitochondrial DNA and protein contents observed in IUGR placentas are probably due to down-regulation of ERR $\gamma$  expression. This finding suggests that ERR $\gamma$  has a major role in the control of placental

development. (Fertil Steril<sup>®</sup> 2015;104:483–90. ©2015 by American Society for Reproductive Medicine.)

**Key Words:** IUGR, preeclampsia, mitochondrial biogenesis, estrogen-related receptor  $\gamma$ , ERR $\gamma$ , ESRRG



Use your smartphone to scan this QR code and connect to the discussion forum for this article now.\*

**Discuss:** You can discuss this article with its authors and with other ASRM members at http:// fertstertforum.com/poidatzd-erry-mitochondria-iugr/

Download a free QR code scanner by searching for "QR scanner" in your smartphone's app store or app marketplace

ntrauterine growth restriction (IUGR) is characterized by low fetal head circumference, length, and weight (1). A wide variety of genetic, metabolic, vascular, and autoimmune disorders and infectious diseases are known to induce this pathology. Regardless of whether IUGR is isolated or associated with hypertensive disorders (such as pre-eclampsia [PE], gesta-

- Received January 7, 2015; revised May 6, 2015; accepted May 7, 2015; published online June 6, 2015. D.P. has nothing to disclose. E.D.S. has nothing to disclose. F.D. has nothing to disclose. H.M. has nothing to disclose. V.S. has nothing to disclose. F.V. has nothing to disclose. P.D.M. has nothing to disclose. M.-N.D. has nothing to disclose.
- Reprint requests: Dorothée Poidatz, Ph.D., Université Versailles Saint Quentin, UPCG-EA 2493, 2 avenue de la source de la Bièvre, Montigny-le-Bretonneux F-8180, France (E-mail: dorothee. poidatz@neuf.fr).

Fertility and Sterility® Vol. 104, No. 2, August 2015 0015-0282/\$36.00 Copyright ©2015 American Society for Reproductive Medicine, Published by Elsevier Inc. http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.05.005 tional hypertension, and chronic hypertension), IUGR is associated with elevated perinatal mortality and morbidity. Pre-eclampsia is a multisystem disorder that affects 2%–8% of pregnancies worldwide (2). The main characteristics of PE are maternal hypertension and proteinuria that can be associated to edema.

The placenta plays a key role in embryonic development by transporting nutrients and exchanging gases between the maternal and fetal circulatory systems. It is well known that development of the placenta depends on the controlled growth, invasion, and differentiation of trophoblastic cells. For instance, placentas affected by IUGR and PE are characterized by a thicker placental barrier (3), poor invasion of maternal vessels (4, 5), poor trophoblast differentiation (6, 7), and aberrant angiogenesis (5, 8). Although 30% of the cases of IUGR have clear fetal, maternal, or placental causes, the remainder occur in apparently healthy women. Hence, the molecular mechanisms involved in placental development failures leading to IUGR have yet to be described.

Mitochondria perform numerous functions related to several distinct biochemical processes, such as the tricarboxylic acid cycle, oxidative phosphorylation, amino acid and lipid metabolism, calcium homeostasis, heme and amino acid biosynthesis, apoptosis, and cell differentiation. The role of mitochondria in energy production is critically important during embryo development and for placental function. Indeed, several studies have described the association between mitochondrial protein mutations and a high incidence of PE and IUGR (9, 10). Moreover, a recent study showed that the impairment of mitochondrial function in mice (using mitochondrial inhibitors) was associated with lower placental and fetal weights (11). Last, anomalies in mitochondrial DNA content, activity, and ultrastructure have been described in both IUGR and PE placentas (12–15). Taken as a whole, these observations suggest that mitochondria have a predominant role in IUGR and PE.

A number of complex pathways control constant metabolic needs and mitochondrial activity in the placenta. The estrogen-related receptor (ERR) family controls a vast gene network involved in all aspects of energy metabolism (including fat and glucose metabolism) and mitochondrial biogenesis and function (16). The three ERRs (ERR $\alpha$ , - $\beta$ , and  $-\gamma$ , also known respectively as NR3B1, -B2, and -B3) are orphan nuclear receptors with a high degree of homology with the estrogen receptors  $\text{ER}\alpha$  and  $\text{ER}\beta$ . Despite these similarities, the ERRs are not activated by estrogens and do not bind to the ER response element in vivo (16). The ERRs regulate the expression of various target genes by binding to the ERR response element as a monomer, a dimer, or a heterodimer (17). Furthermore, the ERRs act as constitutive transcriptional factors and are regulated by cellular coactivators and corepressors. The peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivators-1 $\alpha$  and -1 $\beta$  (PGC-1 $\alpha$  and PGC-1 $\beta$ ) are major ERR coactivators (18). These transcriptional coactivators are known to work in concert with the ERRs to regulate mitochondrial biogenesis and metabolic pathways and thus maintain cellular energy homeostasis (19). The ERRs can also be stimulated by members of the steroid receptor coactivator family (20) and peroxisome proliferator-activated receptors  $\beta$  and  $\delta$  (21). Sirtuin 1 (SIRT1) is a nutrientsensing deacetylase whose levels and activity increase with caloric restriction to promote efficient energy use (22). In cardiac cells, SIRT1 enhances PGC-1a activity and thus ERR activity and mitochondrial activity (23). Conversely, transcriptional activity of ERR can be repressed by the receptor interacting protein-140 (24) or the orphan nuclear receptor small heterodimer partner (25). Estrogen-related receptor- $\gamma$ 

is strongly expressed in tissues with elevated metabolic and energy demands, such as heart, kidney, adipose tissue, and placenta (26–28). Estrogen-related receptor- $\gamma$  has also been described as a cell differentiation transcriptional activator in various tissues (29–31). We recently reported that [1] ERR $\gamma$  expression increases over the course of pregnancy in human placentas, and [2] ERR $\gamma$  has a major role in mitochondrial metabolism and differentiation in the firsttrimester human placenta (28, 32).

Given that ERR $\gamma$  is a major inducer of mitochondrial biogenesis, we hypothesized that ERR $\gamma$  expression might be dysregulated in IUGR pathology. We therefore decided to measure the mitochondrial DNA and protein contents in samples of placenta from normal, IUGR, and IUGR associated with PE pregnancies. Moreover, we measured ERR $\gamma$ , PGC-1 $\alpha$ , and SIRT1 messenger RNA (mRNA) expression in control vs. IUGR placentas.

#### MATERIALS AND METHODS Tissue Collection

This study was approved by the local ethics committee (Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Médicale, reference 01-78), and informed consent was obtained from each donor before the sample collection. Clinical characteristics of the control and IUGR groups are summarized in Table 1. Placental samples were collected after elective cesarean section in 30 normal pregnancies (referred to henceforth as control placentas). The indications for cesarean section were not related to fetal growth status. Placental samples were also collected from 39 pregnancies with IUGR (referred to henceforth as IUGR placentas). The main inclusion criterion for this group was a birth weight below the 10th percentile for gestational age (using growth charts for the French population). Eight placental samples from cases of IUGR associated with PE were also collected (referred to henceforth as IUGR+PE placentas). Pre-eclampsia was defined as the onset of maternal hypertension and proteinuria after 20 weeks' gestation (systolic blood pressure  $\geq$  140 mm Hg; diastolic blood pressure  $\geq$  90 mm Hg; proteinuria  $\geq$  300 mg per 24 hours). Anapathologic analyses revealed that PE placentas presented vascular lesions.

The main exclusion criteria for the control and IUGR groups were multiple pregnancies, fetuses with chromosomal abnormalities, placental abruption, prolonged membrane rupture, fetal congenital abnormalities, suspected intrauterine viral infection, and maternal smoking.

#### Immunohistochemistry

Fifteen placental samples (five control, five IUGR, and five IUGR+PE) were processed as previously described (33). Nonspecific IgG binding was blocked by incubation in phosphate-buffered saline with 3% bovine serum albumin for 20 minutes. The slides were rinsed in phosphate-buffered saline and then incubated with the goat polyclonal primary anti-ERR $\gamma$  antibody (sc-32969; 1:75; Santa Cruz Biotechnology) for 30 minutes at 37°C or with the mouse monoclonal primary antibody anti-cytochrome c oxidase

#### TABLE 1

#### Characteristics of the study population.

	Total IUGR (n = 47)	
Controls (n $=$ 30)	IUGR (n = $39$ )	IUGR + PE (n = 8)
$\begin{array}{c} 37 \pm 0.14 \\ 32.06 \pm 0.72 \\ 30 \\ 24.98 \pm 0.85 \\ 13/17 \\ 3,468 \pm 63.88 \\ 624.90 \pm 2.9^{a} \\ 30 \\ 0 \\ 0 \end{array}$	$\begin{array}{c} 34.31 \pm 0.45^{***} \\ 30.38 \pm 0.97 \\ 39 \\ 22.17 \pm 0.63^{**} \\ 19/21 \\ 2,074 \pm 92.12^{***} \\ 345.97 \pm 18.25^{**} \\ 0 \\ 32 \\ 8 \end{array}$	$\begin{array}{c} 32.88 \pm 1.17^{***} \\ 30.90 \pm 1.38 \\ 8 \\ 23.26 \pm 1.46^{\dagger} \\ 7/3 \\ 1,643 \pm 254.3^{***} \\ 264.8 \pm 30.67^{*} \\ 0 \\ 6 \\ 4 \end{array}$
	Controls (n = 30) $37 \pm 0.14$ $32.06 \pm 0.72$ 30 $24.98 \pm 0.85$ 13/17 $3,468 \pm 63.88$ $624.90 \pm 2.9^{a}$ 30 0 0 o	Controls (n = 30)IUGR (n = 39) $37 \pm 0.14$ $34.31 \pm 0.45^{***}$ $32.06 \pm 0.72$ $30.38 \pm 0.97$ $30$ $39$ $24.98 \pm 0.85$ $22.17 \pm 0.63^{**}$ $13/17$ $19/21$ $3,468 \pm 63.88$ $2,074 \pm 92.12^{***}$ $624.90 \pm 2.9^a$ $345.97 \pm 18.25^{**}$ $30$ $0$ $0$ $32$ $0$ $8$

\* $P_{-0.5}^{+}$ ;  $P_{-0.1}^{+}$ ;  $P_{-0.01}^{+}$ ;  $P_{-0$ 

Poidatz. Role of ERRy and mitochondria in IUGR. Fertil Steril 2015.

subunit Vic, COX6c (sc-390414; 1:100; Santa Cruz Biotechnology) for 1 hour at room temperature. After several washes, slides were incubated with biotinylated secondary antibody for 20 minutes at room temperature and then with peroxidase-conjugated streptavidin for 30 minutes at room temperature (Super Sensitive Link-Label IHC Detection System; BioGenex). The slides were developed with a dimethylaminoazobenzene detection kit (iVIEW DAB Detection Kit; Ventana Medical Systems). Slides were then counterstained with hematoxylin for 1 minute. As negative controls, sections were processed in the absence of primary antibody. Digital images of dimethylaminoazobenzene-stained placenta slides were obtained at  $20 \times$  magnification using a whole-slide scanner (Aperio AT2, Leica Biosystems). Specific immunostaining over the whole slide area was quantified using Aperio ImageScope software (Leica Biosystems).

#### **Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction**

Total RNA (0.5  $\mu$ g) was extracted and reverse transcribed as previously described (28). Quantitative PCR was performed using a LightCycler480 instrument from Roche Diagnostics, using the primer sets indicated in Table 2. The second derivative maximum method was used to automatically determine the crossing point for individual samples. The genes coding for ribosomal protein L13A (RPL13A), TATA-binding protein (TBP), and  $\beta$ -2 microglobulin were chosen as reference genes, as previously described (34). For each sample the concentration ratio (target RNA/three reference mRNAs) was calculated using RelQuant software (Roche Biochemicals) and expressed in arbitrary units. The data were expressed as percentages of the control value. Calibration curves were log-linear over the quantification range, with a correlation coefficient  $(r^2) > 0.99$ and an efficiency ranging from 1.8 to 2.

#### TABLE 2

Primer set	Sequence	PCR product (bp)
ERR <sub>Y</sub> 1		
Sense	5′ TGG TCC CAA CTG GCT GTG CC 3′	129
Antisense	3′ CC AAC GGC CAG CGT GTA CCT 5′	
PGC-1α		
Sense	5' ACT GCA GGC CTA ACT CCA CCC AC 3'	191
Antisense	3' CC CGG CCT CGT TAG GCT CAA 5'	
SIRT1		
Sense	5' AAA AAC CTC CAC GAA CAC AAA AA 3'	143
Antisense	3' C TAA CAG TGT GAA AAT CTG GTT CGT 5'	
ТВР		
Sense	5′ TGC ACA GGA GCC AAG AGT GAA 3′	132
Antisense	3' CAC ATC ACA GCT CCC CAC CA 5'	
$\beta$ 2 microglobulin		
Sense	5' TGC TGT CTC CAT GTT TGA TGT ATC T 3'	86
Antisense	3' TCT CTG CTC CCC ACC TCT AAG T 5'	
RPL13A		
Sense	5' CCT GGA GGA GAA GAG GAA AGA GA 3'	125
Antisense	3′ TTG AGG ACC TCT GTG TAT TTG TCA A 5′	
Note: RPL13A = ribosomal protein L13A; TBP = TATA-b	inding protein.	
Poidatz. Role of ERRy and mitochondria in IUGR. Fertil Sta	eril 2015.	

#### **Quantification of Mitochondrial DNA**

Total DNA was extracted from placental samples using the QIAamp DNA Minikit (Qiagen), according to the instructions provided by the manufacturer. Nuclear and mitochondrial DNA content was quantified using real-time PCR, as previously described (35).

Primers used for mitochondrial DNA were as follows: mt-8294F 5'-CCACTGTAAAGCTAACTTAGCATTAACC-3'; mt-84 36R 5'-GTGATGAGGAATAGTGTAAGGAGTATGG-3'. Probe used for mitochondrial DNA: MT-8345 5' VIC-CCAACACCT CTTTACAGTGAAATGCCCCA-TAMRA 3'. Primers used for nuclear DNA: RB1-2672F 5'-CCAGAAAATAAATCAGATGG TATGTAACA-3'; RB1-2750R 5'-TGGTTTAGGAGGGTTGCTTC C-3'. Probe used for nuclear DNA: 5' FAM-CAGCACT TCTTTTGAGCACACGGTCG-TAMRA 3'.

Relative mitochondrial DNA content was expressed as the ratio of mitochondrial DNA to nuclear DNA.

#### **Data Analysis**

Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Intergroup comparisons of clinical characteristics, mitochondrial DNA content, and mRNA expression were performed using a nonparametric Mann-Whitney *t* test with Bonferroni adjustment. Correlations between values were estimated using the Spearman correlation. All tests were performed using GraphPad Prism software (version 6, GraphPad Software).

#### RESULTS

#### **Characteristics of the Study Population**

Maternal and fetal baseline demographic data for cases and controls are compared in Table 1. In each group the individual prepregnancy body mass index mean values ranged between 18.5 and 25 kg/m<sup>2</sup>. The IUGR and control placentas did not differ significantly in terms of maternal age and the fetal gender ratio (female/male). However, the fetal female/male gender ratio was significantly higher in the IUGR+PE group. As expected, gestational age and both fetal and placental weights were significantly lower in the IUGR and IUGR+PE groups than in the control group. Moreover, there were no significant differences between the IUGR and IUGR+PE groups in terms of gestational age and fetal and placental weights. Last, the ratios birth weight/placental weight, an index of placental efficiency, did not differ significantly in the IUGR and control groups.

#### **Mitochondrial Content**

Mitochondrial DNA content was markedly lower in the IUGR and IUGR+PE placentas than in control placentas (-69%and -26%, respectively). However, the mitochondrial DNA content was similar in IUGR and IUGR+PE placentas (Fig. 1A). Mitochondrial DNA content was significantly and positively correlated with fetal weight (r = 0.5880, P < .001) when considering the study population as a whole (Fig. 1B). To confirm the results for mitochondrial DNA content, we studied the expression of COX6c. This protein is localized on the mitochondrial inner membrane and is considered to be a

486

reliable marker of mitochondrial content (36, 37). The COX6c protein is expressed in trophoblastic and mesenchymal cells, with a stronger expression in trophoblastic cells. We observed that COX6c protein was less expressed in IUGR (Fig. 1C, b and e) and IUGR+PE placentas (Fig. 1C, c and e) than in control placentas (Fig. 1C, a and e).

#### ERR $\gamma$ , PGC-1 $\alpha$ , and SIRT1 mRNA Expression Levels

Estrogen-related receptor- $\gamma$  mRNA expression was significantly lower in IUGR and IUGR+PE placentas than in control placentas (-53% and -69%, respectively). Intrauterine growth restriction and IUGR+PE placentas did not differ significantly in terms of ERR $\gamma$  mRNA expression (Fig. 2A).

As shown in Figure 2B and C, PGC-1 $\alpha$  and SIRT1 mRNA expression were significantly lower in IUGR+PE placentas than in control placentas (-24% and -60%, respectively). However, IUGR placentas did not differ significantly from control or IUGR+PE placentas in terms of PGC-1 $\alpha$  and SIRT1 mRNA expression (Fig. 2B and C).

#### **ERR Protein Expression**

To confirm the mRNA expression results, we studied ERR $\gamma$  protein expression on histologic sections from control, IUGR, and IUGR+PE placentas (Fig. 2D). Estrogen-related receptor- $\gamma$  protein is expressed in cytotrophoblasts, syncytio-trophoblast, and mesenchymal cells, as previously described in our laboratory (28). Relative quantification of ERR $\gamma$  by immunostaining revealed that ERR $\gamma$  protein was less expressed in IUGR (Fig. 2D, b and e) and IUGR+PE placentas (Fig. 2D, c and e) than in control placentas (Fig. 2D, a and e).

#### DISCUSSION

Intrauterine growth restriction affects 7%–10% of pregnancies and is still a major cause of perinatal mortality and morbidity. The condition occurs when the fetal growth rate falls below the genetic potential. Most cases of IUGR are observed in otherwise healthy mothers, although PE is often associated with this condition. Fundamentally, IUGR and PE result from a malfunctioning placenta, which induced chronic nutrient starvation and inflammation. However, it is still not known why placental development fails in these pregnancies.

A variety of studies in murine models and humans have revealed that mitochondrial protein mutations are associated with abnormally high frequencies of IUGR (38–40). Moreover, it has been demonstrated that mitochondrial DNA content, morphology, respiratory activity, and apoptosis are abnormal in IUGR and/or PE placentas (13, 15, 41, 42). Altogether, these results suggest that placental mitochondrial dysfunction is involved in the pathogenesis of IUGR and PE.

Data on the relationship between IUGR and placental mitochondrial content are scarce and contradictory. Hence, we decided to measure mitochondrial DNA and protein contents in control, IUGR, and IUGR+PE placentas. Mitochondrial DNA content was markedly and significantly lower in IUGR placentas relative to controls and slightly but still significantly lower in IUGR+PE placentas. When considering

#### Fertility and Sterility®



Mitochondrial content. (A) Mitochondrial DNA content was quantified in control (n = 30), IUGR (n = 39), and IUGR+PE (n = 8) placentas, as described in Materials and Methods. Data are reported as the mean  $\pm$  SEM. \**P*<.05, \*\*\**P*<.001. (B) Relationship between placental mitochondrial DNA content and fetal weight in the pooled control, IUGR, and IUGR+PE groups (y intercept = -20.03, slope = 40.97, *P*<.001). (C) Quantification of COX6c protein immunostaining on sections from control (a), IUGR (b), and IUGR+PE (c) placentas, as described in Materials and Methods. The negative control was processed in the absence of primary antibody on human control placentas (d). The figure shows one representative from five separate experiments for each group. Magnification, ×20. (e) Relative quantification of COX6c immunostaining (n = 5). Data are reported as the mean  $\pm$  SEM. \**P*<.05, \*\**P*<.01. ns = nonsignificant. *Poidatz. Role of ERRy and mitochondria in IUGR. Fertil 2015.* 

the study population as a whole, we also observed a positive correlation between fetal weight and DNA mitochondrial content. These results contradict previous reports describing a higher mitochondrial DNA content in human IUGR placentas (15, 43). The latter researchers suggested that the increased mitochondrial DNA content represents an adaptation of the placental metabolism to the fetal calorie restriction. There are at least two possible explanations for the discrepancy between our present results and the literature data. First, the studies differed in terms of the clinical characteristics of the study population. Indeed, in our IUGR group, the birth weight was higher than that reported by Mandò et al. (43) (2 kg and 1.4 kg, respectively). Second, the studies could differ also by the proportion of cell types in the placental samples used. Indeed, a recent study observed low mitochondrial DNA content specifically in human cytotrophoblasts isolated from IUGR placentas (43). Our samples could be enriched in villous trophoblast,

explaining the lower mitochondrial DNA content in our present findings. Moreover, another recent study observed low placental mitochondrial DNA content in small-forgestational-age infants (44). Furthermore, our immunostaining results showed that levels of the mitochondrial protein COX6c were much lower in IUGR and IUGR+PE placentas than in control placentas. These last results confirm our observations on mitochondrial DNA content. Taken as a whole, these results clearly demonstrate that mitochondrial content is abnormally low in IUGR placentas.

To further explain the low mitochondrial content in IUGR and IUGR+PE placentas, we studied ERR $\gamma$  mRNA and protein expression. Estrogen-related receptor- $\gamma$  is known to be a major regulator of mitochondrial activity and biogenesis (16). We observed low ERR $\gamma$  expression in IUGR placentas and very low expression in IUGR+PE placentas relative to control placentas. Hence, the present study is the first to report an association between mitochondrial content and ERR $\gamma$ 

#### ORIGINAL ARTICLE: REPRODUCTIVE SCIENCE



Estrogen-related receptor- $\gamma$  expression and PGC-1 $\alpha$  and SIRT1 mRNA expressions. Total RNA was extracted from control (n = 30), IUGR (n = 39), and IUGR+PE (n = 8) placentas, as described in Materials and Methods. Estrogen-related receptor- $\gamma$ 1 (**A**), PGC-1 $\alpha$  (**B**), and SIRT1 (**C**) mRNA expression were quantified as described in Materials and Methods. Data are reported as the mean  $\pm$  SEM. \**P*<.05, \*\**P*<.01, \*\*\**P*<.001. (**D**) Quantification of ERR $\gamma$  protein immunostaining on sections from control (a), IUGR (b), and IUGR+PE (c) placentas, as described in Materials and Methods. The negative control was processed in the absence of primary antibody on human control placentas (d). The figure shows one representative from five separate experiments for each group. Magnification, ×20. (e) Relative quantification of ERR $\gamma$  immunostaining (n = 5). Data are reported as the mean  $\pm$  SEM. \**P*<.005, \*\**P*<.01. ns = nonsignificant. *Poidatz. Role of ERR\gamma and mitochondria in IUGR. Fertil 2015.* 

expression in IUGR and IUGR+PE placentas. Our finding suggests that the down-regulation of ERR $\gamma$  expression could be involved in the abnormally low placental mitochondrial content seen in IUGR.

To further study the molecular mechanisms of ERR $\gamma$  deregulation in IUGR, we measured the expression of PGC-1 $\alpha$  and SIRT1. Indeed, these factors are known coregulators of ERR $\gamma$ . More precisely, it is well established that PGC1- $\alpha$ regulates directly the ERRs activity and expression in various cell types (18, 45). Moreover, SIRT1 enhances PGC-1 $\alpha$  activity by deacetylation and thus indirectly increases ERR activity (23). We observed significantly lower PGC-1 $\alpha$  and SIRT1 mRNA expression in the IUGR+PE placentas but not in the IUGR placentas. These results might explain the strong down-regulation of ERR $\gamma$  in IUGR+PE placentas, relative to the IUGR and control placentas. Given that the IUGR and control placentas did not differ significantly in terms of PGC-1 $\alpha$ and SIRT1 mRNA expression, the low ERR $\gamma$  expression in isolated IUGR might result from [1] deregulation of other ERR $\gamma$  corepressors (such as small heterodimer partner or receptor interacting protein-140) and/or [2] deregulation of miR-22 and/or miR-378\*, which reportedly down-regulate PGC-1 $\alpha$ , SIRT1, and ERR $\gamma$ , respectively (23, 46). To verify these hypotheses, we are currently performing additional experiments.

Several lines of evidence suggest that mitochondria have a role in the differentiation of a wide variety of cell types, such as myoblasts (47), decidual cells (48), adipocytes (49), and human embryonic stem cells (50). Furthermore, ERR $\gamma$  is also involved in cell differentiation (30, 31). We have previously reported that [1] mitochondria are involved in the control of the cytotrophoblast differentiation, [2] ERR $\gamma$  promoted trophoblast differentiation, and [3] roles of ERR $\gamma$  were mainly mediated by the control of mitochondria functions (32). In the present study the low ERR $\gamma$  expression and mitochondrial contents observed in IUGR placentas might explain the trophoblast differentiation defects described in IUGR and PE.

#### Fertility and Sterility®

In conclusion, we demonstrated that low mitochondrial DNA and protein contents were associated with low ERR $\gamma$  expression in IUGR placentas and very low ERR $\gamma$  expression in IUGR+PE placentas relative to control placentas. These results suggest that ERR $\gamma$  down-regulation is correlated with the severity of IUGR. In this context, ERR $\gamma$  expression might be a reliable marker of IUGR. Understanding the causes of ERR $\gamma$  deregulation in this pathology might be of great scientific and clinical value and might provide useful therapeutic targets for preventing IUGR in human pregnancies.

Acknowledgments: The authors thank the Department of Gynecology and Obstetrics at Poissy-Saint-Germain Medical Center for providing first-trimester human placental tissue.

#### REFERENCES

- O'Connor C, Stuart B, Fitzpatrick C, Turner MJ, Kennelly MM. A review of contemporary modalities for identifying abnormal fetal growth. J Obstet Gynaecol 2013;33:239–45.
- Duley L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. Semin Perinatol 2009;33:130–7.
- Mayhew TM. Villous trophoblast of human placenta: a coherent view of its turnover, repair and contributions to villous development and maturation. Histol Histopathol 2001;16:1213–24.
- Khong TY, De Wolf F, Robertson WB, Brosens I. Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by preeclampsia and by small-for-gestational age infants. Br J Obstet Gynaecol 1986;93:1049–59.
- Arroyo JA, Winn VD. Vasculogenesis and angiogenesis in the IUGR placenta. Semin Perinatol 2008;32:172–7.
- Plaks V, Rinkenberger J, Dai J, Flannery M, Sund M, Kanasaki K, et al. Matrix metalloproteinase-9 deficiency phenocopies features of preeclampsia and intrauterine growth restriction. Proc Natl Acad Sci U S A 2013;110: 11109–14.
- Brown LM, Lacey HA, Baker PN, Crocker IP. E-cadherin in the assessment of aberrant placental cytotrophoblast turnover in pregnancies complicated by pre-eclampsia. Histochem Cell Biol 2005;124:499–506.
- Furuya M, Kurasawa K, Nagahama K, Kawachi K, Nozawa A, Takahashi T, et al. Disrupted balance of angiogenic and antiangiogenic signalings in preeclampsia. J Pregnancy 2011;2011:123717.
- Yang Z, Zhao Y, Bennett MJ, Strauss AW, Ibdah JA. Fetal genotypes and pregnancy outcomes in 35 families with mitochondrial trifunctional protein mutations. Am J Obstet Gynecol 2002;187:715–20.
- Berkowitz K, Monteagudo A, Marks F, Jackson U, Baxi L. Mitochondrial myopathy and preeclampsia associated with pregnancy. Am J Obstet Gynecol 1990;162:146–7.
- Wakefield SL, Lane M, Mitchell M. Impaired mitochondrial function in the preimplantation embryo perturbs fetal and placental development in the mouse. Biol Reprod 2011;84:572–80.
- Muralimanoharan S, Maloyan A, Mele J, Guo C, Myatt LG, Myatt L. MIR-210 modulates mitochondrial respiration in placenta with preeclampsia. Placenta 2012;33:816–23.
- Shibata E, Nanri H, Ejima K, Araki M, Fukuda J, Yoshimura K, et al. Enhancement of mitochondrial oxidative stress and up-regulation of antioxidant protein peroxiredoxin III/SP-22 in the mitochondria of human pre-eclamptic placentae. Placenta 2003;24:698–705.
- Wawrzycka B, Zarebska A, Łańcut M, Wawrzycki B, Czerny K. Ultrastructural changes in the syncytiotrophoblast in some types of pathological pregnancy. Ann Univ Mariae Curie-skłodowska Sect Med 2001;56:143–9.
- Lattuada D, Colleoni F, Martinelli A, Garretto A, Magni R, Radaelli T, et al. Higher mitochondrial DNA content in human IUGR placenta. Placenta 2008;29:1029–33.
- 16. Giguère V. Transcriptional control of energy homeostasis by the estrogenrelated receptors. Endocr Rev 2008;29:677–96.

- Huppunen J, Aarnisalo P. Dimerization modulates the activity of the orphan nuclear receptor ERRgamma. Biochem Biophys Res Commun 2004;314: 964–70.
- Huss JM, Kopp RP, Kelly DP. Peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1α (PGC-1α) coactivates the cardiac-enriched nuclear receptors estrogen-related receptor-α and -γ. Identification of novel leucine-rich interaction motif within PGC-1α. J Biol Chem 2002;277:40265–74.
- **19.** Deblois G, St-Pierre J, Giguère V. The PGC-1/ERR signaling axis in cancer. Oncogene 2013;32:3483–90.
- Jeong JW, Kwak I, Lee KY, White LD, Wang XP, Brunicardi FC, et al. The genomic analysis of the impact of steroid receptor coactivators ablation on hepatic metabolism. Mol Endocrinol Baltim Md 2006;20:1138–52.
- Gan Z, Rumsey J, Hazen BC, Lai L, Leone TC, Vega RB, et al. Nuclear receptor/ microRNA circuitry links muscle fiber type to energy metabolism. J Clin Invest 2013;123:2564–75.
- Gillum MP, Erion DM, Shulman GI. Sirtuin-1 regulation of mammalian metabolism. Trends Mol Med 2011;17:8–13.
- Gurha P, Wang T, Larimore AH, Sassi Y, Abreu-Goodger C, Ramirez MO, et al. microRNA-22 promotes heart failure through coordinate suppression of PPAR/ERR-nuclear hormone receptor transcription. PLoS One 2013;8:e75882.
- Castet A, Herledan A, Bonnet S, Jalaguier S, Vanacker JM, Cavaillès V. Receptor-interacting protein 140 differentially regulates estrogen receptorrelated receptor transactivation depending on target genes. Mol Endocrinol Baltim Md 2006;20:1035–47.
- 25. Sanyal S, Kim JY, Kim HJ, Takeda J, Lee YK, Moore DD, et al. Differential regulation of the orphan nuclear receptor small heterodimer partner (SHP) gene promoter by orphan nuclear receptor ERR isoforms. J Biol Chem 2002;277:1739–48.
- Takeda Y, Liu X, Sumiyoshi M, Matsushima A, Shimohigashi M, Shimohigashi Y. Placenta expressing the greatest quantity of bisphenol A receptor ERR{gamma} among the human reproductive tissues: predominant expression of type-1 ERRgamma isoform. J Biochem (Tokyo) 2009;146: 113–22.
- Heard DJ, Norby PL, Holloway J, Vissing H. Human ERRgamma, a third member of the estrogen receptor-related receptor (ERR) subfamily of orphan nuclear receptors: tissue-specific isoforms are expressed during development and in the adult. Mol Endocrinol Baltim Md 2000;14:382–92.
- Poidatz D, Dos Santos E, Brulé A, De Mazancourt P, Dieudonné MN. Estrogen-related receptor gamma modulates energy metabolism target genes in human trophoblast. Placenta 2012;33:688–95.
- Eichner LJ, Giguère V. Estrogen related receptors (ERRs): a new dawn in transcriptional control of mitochondrial gene networks. Mitochondrion 2011; 11:544–52.
- Kubo M, Ijichi N, Ikeda K, Horie-Inoue K, Takeda S, Inoue S. Modulation of adipogenesis-related gene expression by estrogen-related receptor gamma during adipocytic differentiation. Biochim Biophys Acta 2009;1789:71–7.
- Poidatz D, Dieudonné MN, Dos Santos E, Gronier H, Vialard F, Maury B, et al. Trophoblast syncytialisation necessitates mitochondrial function through estrogen related receptor-γ activation. Mol Hum Reprod 2015;21:206–16.
- Dakouane-Giudicelli M, Duboucher C, Fortemps J, Missey-Kolb H, Brulé D, Giudicelli Y, et al. Characterization and expression of netrin-1 and its receptors UNC5B and DCC in human placenta. J Histochem Cytochem 2010;58: 73–82.
- Benaitreau D, Dos Santos E, Leneveu MC, De Mazancourt P, Pecquery R, Dieudonné MN. Adiponectin promotes syncytialisation of BeWo cell line and primary trophoblast cells. Reprod Biol Endocrinol 2010;8:128.
- Andréasson H, Gyllensten U, Allen M. Real-time DNA quantification of nuclear and mitochondrial DNA in forensic analysis. Biotechniques 2002;33: 402–4. 407–411.
- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. Cell 1998;94:491–501.
- Lee CH, Wu SB, Hong CH, Liao WT, Wu CY, Chen GS, et al. Aberrant cell proliferation by enhanced mitochondrial biogenesis via mtTFA in arsenical skin cancers. Am J Pathol 2011;178:2066–76.

#### ORIGINAL ARTICLE: REPRODUCTIVE SCIENCE

- Gispert S, Parganlija D, Klinkenberg M, Dröse S, Wittig I, Mittelbronn M, et al. Loss of mitochondrial peptidase Clpp leads to infertility, hearing loss plus growth retardation via accumulation of CLPX, mtDNA and inflammatory factors. Hum Mol Genet 2013;22:4871–87.
- Tavares MV, Santos MJ, Domingues AP, Pratas J, Mendes C, Simões M, et al. Antenatal manifestations of mitochondrial disorders. J Inherit Metab Dis 2013;36:805–11.
- Honzik T, Tesarova M, Magner M, Mayr J, Jesina P, Vesela K, et al. Neonatal onset of mitochondrial disorders in 129 patients: clinical and laboratory characteristics and a new approach to diagnosis. J Inherit Metab Dis 2012; 35:749–59.
- Mayeur S, Lancel S, Theys N, Lukaszewski MA, Duban-Deweer S, Bastide B, et al. Maternal calorie restriction modulates placental mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency: putative involvement in fetoplacental growth defects in rats. Am J Physiol Endocrinol Metab 2013; 304:E14–22.
- Bartha JL, Visiedo F, Fernández-Deudero A, Bugatto F, Perdomo G. Decreased mitochondrial fatty acid oxidation in placentas from women with preeclampsia. Placenta 2012;33:132–4.
- Mandò C, De Palma C, Stampalija T, Anelli GM, Figus M, Novielli C, et al. Placental mitochondrial content and function in intrauterine growth restriction and preeclampsia. Am J Physiol Endocrinol Metab 2014;306:E404–13.

- 44. Díaz M, Aragonés G, Sánchez-Infantes D, Bassols J, Pérez-Cruz M, de Zegher F, et al. Mitochondrial DNA in placenta: associations with fetal growth and superoxide dismutase activity. Horm Res Paediatr 2014;82: 303–9.
- 45. Liu D, Zhang Z, Teng CT. Estrogen-related receptor-gamma and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha regulate estrogen-related receptor-alpha gene expression via a conserved multihormone response element. J Mol Endocrinol 2005;34:473–87.
- 46. Eichner LJ, Perry MC, Dufour CR, Bertos N, Park M, St-Pierre J, et al. miR-378(\*) mediates metabolic shift in breast cancer cells via the PGC-1β/ ERRγ transcriptional pathway. Cell Metab 2010;12:352–61.
- Wagatsuma A, Sakuma K. Mitochondria as a potential regulator of myogenesis. Scientific World Journal 2013;2013:593267.
- Ma X, Gao F, Rusie A, Hemingway J, Ostmann AB, Sroga JM, et al. Decidual cell polyploidization necessitates mitochondrial activity. PLoS One 2011;6: e26774.
- Ryu MJ, Kim SJ, Choi MJ, Kim YK, Lee MH, Lee SE, et al. Mitochondrial oxidative phosphorylation reserve is required for hormone- and PPAR<sub>γ</sub> agonistinduced adipogenesis. Mol Cells 2013;35:134–41.
- Prowse ABJ, Chong F, Elliott DA, Elefanty AG, Stanley EG, Gray PP, et al. Analysis of mitochondrial function and localisation during human embryonic stem cell differentiation in vitro. PloS One 2012;7:e52214.

# ROLES DE L'ADIPONECTINE ET DE LA LEPTINE A L'INTERFACE FŒTO-MATERNELLE HUMAINE

REVUE

The roles of leptin and adiponectin at the fetal-maternal interface in humans

Esther Dos Santos, **Fabien Duval**, François Vialard, Marie-Noëlle Dieudonné

HORMONE MOLECULAR BIOLOGY AND CLINICAL INVESTIGATION (2015)

## Esther Dos Santos\*, Fabien Duval, François Vialard and Marie-Noëlle Dieudonné The roles of leptin and adiponectin at the fetal-maternal interface in humans

DOI 10.1515/hmbci-2015-0031 Received July 23, 2015; accepted August 25, 2015

Abstract: Infertility now affects one in seven couples, and the prevalence of this condition continues to increase. Ovulatory defects and unknown causes account for more than half of the cases of infertility. It has been postulated that a significant proportion of these cases are directly or indirectly related to obesity, since the presence of excess adipose tissue has a variety of effects on reproductive function. Here, we review on the effects of the two major adipokines (leptin and adiponectin) on fertility, with a focus on the first steps in embryo implantation and the key components of fetal-maternal interface (the placenta and the endometrium). These adipokines are reportedly involved in the regulation of cell proliferation and differentiation, and as such affect local angiogenesis, immune tolerance and inflammatory processes in placental and endometrial tissues. In placental cells, leptin and adiponectin also modulate trophoblast invasiveness and the nutrient supply. These observations strongly suggest by interfering with the placenta and endometrium, adipokines can create a favorable environment for embryo implantation and have a key role in fetal-maternal metabolism, fetalmaternal communication, and gestation. Given that reproductive functions are tightly coupled to the energy balance, metabolic abnormalities may lead to the development of complications of pregnancy and changes in fetal growth. In this context, we suggest that the leptin/ adiponectin ratio may be a clinically valuable marker for detecting a number of pathologies in pregnancy.

Keywords: adiponectin; endometrial receptivity; fetalmaternal interface; leptin; placenta; pregnancy pathologies; reproduction.

#### Introduction

Obesity [as defined by a body mass index (BMI) > 30 kg/m<sup>2</sup>] is a major health problem worldwide. The prevalence of obesity is increasing in both development and developing countries. For example, 12%-13% of adults in France are obese. Furthermore, obesity is now common in children and young adults, which increases the number of overweight or obese women of childbearing age. Obesity is associated with many different pathological complications, including respiratory, cardiovascular, and endocrine conditions. Excess adipose tissue also has significant reproductive repercussions in women. Several epidemiological studies of large cohorts of pregnant women have clearly demonstrated a link between BMI and the likelihood of pregnancy. The likelihood of taking more than a year to conceive is 27% higher in overweight women and 78% higher in obese women [1]. Moreover, maternal obesity is associated with a range of gynecologic disorders and complications of pregnancy, including gestational diabetes mellitus, pre-eclampsia, macrosomia, fetal growth restriction, and intra-uterine fetal death [2]. Obese patients have also a significant higher incidence of adverse reproductive outcomes (such as spontaneous abortion); indeed, the presence of excess adipose tissue increases the risk of recurrent, spontaneous abortion (RSA) by a factor of two [3]. Furthermore, there is recent evidence to suggest that maternal obesity is associated with the development of obesity in the offspring later in life [4]. There are at least two possible explanations for these observations. Firstly, epigenetic modifications occur in placental tissue as a result of chronic inflammation and excess nutrient supply during placental development; in turn, this can alter fetal growth [4]. The placental phenotype is known to change rapidly to optimize fetal growth in response to external environmental stimuli. Although this type of research is still in the preliminary stages, there is compelling evidence from human studies to show

<sup>\*</sup>Corresponding author: Esther Dos Santos, GIG-EA 2493, Université de Versailles-St Quentin, UFR des Sciences de la Santé, F-78180 Montigny le Bretonneux, France; and Service de Biologie Médicale, CHI de Poissy-Saint-Germain, F-78300 Poissy, France, E-mail: esther.dos-santos@uvsg.fr

Fabien Duval and Marie-Noëlle Dieudonné: GIG-EA 2493, Université de Versailles-St Quentin, UFR des Sciences de la Santé, F-78180 Montigny le Bretonneux, France

François Vialard: GIG-EA 2493, Université de Versailles-St Quentin, UFR des Sciences de la Santé, F-78180 Montigny le Bretonneux, France; and Département de Biologie de la Reproduction, Cytogénétique, Gynécologie et Obstétrique, CHI de Poissy-Saint-Germain, F-78300 Poissy, France

that altered epigenetics may contribute (at least to some extent) to the trans-generational transmission of obesity and metabolic syndrome [5]. Secondly, maternal obesity cause changes in fetal muscle development by shifting mesenchymal stem cell differentiation from myogenesis towards adipogenesis. This shift is likely to have a permanent effect on the offspring's skeletal muscle properties and may predispose the offspring to cardiovascular complications and even metabolic syndrome [6].

Obesity is associated with various reproductive complications, including anovulation, altered folliculogenesis, poor oocyte quality and maturation, a low embryo implantation rate, poor endometrial receptivity, inappropriate fetal development, an elevated risk of miscarriage, altered myometrial contractility during maternal labor and delivery, and elevated fetal and maternal morbidity and mortality [1, 3, 7, 8]. The impacts of excess adipose tissue on a woman's reproductive function and on her offspring are summarized in Figure 1.

The mechanisms underlying the impact of excess adipose tissue on pregnancy and child growth have not been characterized but are attracting increasing research interest. Although many different factors can affect female fertility, obese women requesting assisted conception are almost always advised to lose weight. For example, it has been reported that a weight loss of 10% (as a result of a lifestyle intervention program) improves female fertility and reduces the spontaneous abortion rate by half [3].

White adipose tissue secretes a number of adipokines with putative effects on reproductive function. Leptin and adiponectin are the two best-studied adipokines in this respect; their specific effects on fertility have been extensively described in the literature and result from either central effects on the hypothalamus or peripheral effects on the ovary, the reproductive tract, endometrial development or embryo implantation.

The objective of the present article was to review the actions of both leptin and adiponectin at the fetalmaternal interface and focus on the activated molecular mechanisms (i.e. signal transduction pathways and target genes). Moreover, we provide a succinct overview of the two adipokines' involvement in complications of pregnancy and consider whether the leptin/adiponectin ratio can be used to predict such pathologies.

#### Leptin's main functions in humans

Leptin (the product of the ob gene) is a 16 kDa nonglycosylated 146-amino-acid protein that was discovered by Zhang and co-workers in 1994 [9]. This adipokine is mainly produced by white adipose tissue and is secreted in response to increases in energy storage. Circulating leptin levels (normal range: 1–15 ng/mL) are directly proportional to the BMI. Thus, obese individuals typically produce higher levels of leptin that leaner individuals [10]. This cytokine-like hormone has many functions, the best characterized of which is the maintenance of wholebody energy homeostasis. It achieves this by acting as a satiety signaling peptide that suppresses food intake and increases energy expenditure at the central level. However, leptin also exerts peripheral actions, including the inhibition of insulin secretion by pancreatic  $\beta$ -cells, the stimulation of glucose use and lipolysis by adipocytes, and sugar transport across the mucosa of the small intestine. Leptin has also been implicated in the modulation of thermogenesis, hematopoiesis and osteogenesis, and has



**Figure 1:** Impact of obesity on reproductive functions in women. This figure summarizes research on the harmful impact of excess adipose tissue on various aspects of reproductive function in women.

been described as a pro-angiogenic, pro-inflammatory and mitogenic factor in various tissues and cell types [11].

Leptin and the leptin receptor share structural and functional similarities with the interleukin 6 (IL6) family of cytokines. The human leptin receptor gene (OB-R) encodes (i) four transmembrane proteins with different C-terminal lengths and sequences and (ii) a soluble isoform lacking the transmembrane domain. Full-length OB-Rb is responsible for the major cell signaling effects of leptin [12]. Once activated, OB-Rb effectively activates itself through several signal transduction pathways. The major pathway is the Janus kinase (JAK)-signal transducers and activators of transcription (STAT) pathway, since leptin promotes JAK-2 and STAT-3 tyrosine phosphorylation. Leptin also stimulates p42 and p44 mitogenactivated protein kinase (MAPK), phosphatidyl inositol-3 kinase (PI3K), Jun kinase (JNK), protein kinase A (PKA), and adenosine monophosphate kinase (AMPK) pathways in different tissues [13].

# Adiponectin's main functions in humans

Adiponectin is a 30 kDa protein that was discovered independently by several research groups in 1995 (one year after leptin); it thus was given a variety of names, including adipose most abundant gene transcript 1 (apM1), adipocyte complement-related protein of 30 kDa (Acrp30), AdipoQ, and gelatin binding protein of 28 kDa (GBP28) [14–16]. It is predominantly produced by adipose tissue and is present at high concentrations in blood plasma (5–15  $\mu$ g/mL in humans, accounting for 0.01% of total plasma proteins) [17]. In contrast to leptin, adiponectin levels are inversely correlated with the accumulation of fat.

Full-length adiponectin (fAD) consists of a NH<sub>2</sub>terminal sequence, a complement C1q-like domain and a COOH-terminal globular domain. It can form multimeric low molecular weight (LMW) complexes, middle molecular weight (MMW) forms (mainly hexamers) and more elaborate high molecular weight (HMW) complexes composed of nine hexamers. The HMW complexes predominate in the human circulation and correspond to the main, active biological form of adiponectin [18]. A truncated form containing only the COOH-terminal globular portion (gAD) is produced by proteolytic cleavage and is also biologically active [19].

In 2003, two specific adiponectin receptors (AdipoR1 and AdipoR2) were identified [20]. AdipoR1 is ubiquitously expressed and displays a high affinity for gAD, whereas

AdipoR2 is predominantly expressed in liver and has a higher affinity for fAD. Both receptors contain seven transmembrane domains but are structurally and functionally distinct from G-protein-coupled receptors. Recent evidence suggests that downstream signaling of the AdipoR involves APPL1, an adaptor protein that is an important mediator in adiponectin-dependent insulin sensitization in skeletal muscle [21]. AdipoR1 and AdipoR2 activate different signal transduction pathways (such as AMPK, PKA, PI3K, and p38/p42/p44 MAPK pathways) [17].

Adiponectin has mainly been described as an insulinsensitizing hormone with an important regulatory role in energy metabolism [22]. The mechanism underlying the increase in insulin sensitivity in response to adiponectin remains to be fully established and may include a multitude of pathways. In skeletal muscle (for example), adiponectin stimulates glucose transport (by increasing GLUT4 translocation [23]), actives insulin signaling, and upregulates molecules involved in fatty acid transport, fatty acid oxidation, and energy dissipation (resulting in a drop in the triglyceride content) [24]. In the liver, adiponectin increases β-oxidation and decreases gluconeogenesis [25]. These metabolic effects of adiponectin are mainly mediated via the AMPK pathway, which acts as a key sensor of the cell's energy status. Moreover, adiponectin has been shown to exert anti-inflammatory, antiangiogenic, anti-atherosclerotic, anti-proliferative, and pro-apoptotic roles in various cell types [26]. Adiponectin is also thought to have an important role in innate immunity and autoimmune phenomena. Furthermore, adiponectin is a member of the defense collagen family and can activate the classical complement pathway. More precisely, adiponectin binds to surface-bound C1q via its globular domain and then activates (i) the uptake of apoptotic cells by macrophages and (ii) the deposition of both C4 and C3 [27]. This observation may account for why adiponectin acts as a scavenging anti-inflammatory molecule and also induces biological sequelae via complement activation.

Many studies have shown that fAD and gAD differ in their effects in humans. For example, fAD's anti-inflammatory, anti-angiogenic, and vasoprotective actions are respectively mediated by inhibition of the effects of the pro-inflammatory TNF $\alpha$ , a reduction in levels of vascular endothelial growth factor (VEGF), and the production of nitric oxide by endothelial cells [28]. Conversely, a range of studies have demonstrated that gAD activates TNF $\alpha$  signaling leading to activation of pro-inflammatory adhesion cascade, increased endothelial proliferation, cell migration, and angiogenesis (with concomitant increases in gene transcription and protein levels of metalloproteinase

**DE GRUYTER** 

and VEGF) [28]. Since fAD and gAD coexist in the blood, it is difficult to understand their respective roles and to explain the numerous discrepancies between studies. Accordingly, it will be essential to perform in vitro experiments that clarify the specific effects of each form of adiponectin.

The metabolic, clinical, and pharmacological characteristics of leptin and adiponectin have been extensively studied. However, the behavior of these adipokines in terms of reproduction (and the first steps in embryo implantation in particular) has received less attention. In the following section, we have tried to clarify and highlight the latter topic.

#### Adipokines and the placenta

In pregnancy in humans, the placenta is a complex organ with an essential role in embryo implantation and the maintenance of pregnancy. The diversity of functions performed by the placenta is spectacular – ranging from anchoring the embryo and preventing its rejection by the maternal immune system to enabling the transport of nutrients, gases, and waste between the mother and the embryo. It has been demonstrated that adverse maternal conditions affect placental morphology, blood flow, and fetal-maternal exchanges. Nevertheless, the placenta is capable of adapting to the maternal environment and protecting the fetus [29].

It is now well established that placental cells can differentiate through one of two distinct pathways. In the villous pathway, mononuclear cytotrophoblasts (CTs) fuse to form a specialized, multinuclear syncytium called the syncytiotrophoblast (ST) on the outer layer of placental villi. Many placental functions required for fetal growth and development and the synthesis of steroid and peptide hormones take place in the ST [30]. In the extravillous pathway, CTs proliferate, differentiate, gain an invasive phenotype, and penetrate into the maternal decidua and myometrium. Invasion by CTs involves protease-mediated degradation of the decidual and endothelial extracellular matrix [particularly by the matrix metalloproteinases (MMPs) 2 and 9] [31]. Moreover, colonization of the maternal spiral artery by invasive CTs enlarges diameter vessels, reduces vessel contractility, and enables constant oxygen delivery at a low blood pressure (in order to favor fetal development) [32]. During the invasion, there is cross-talk between CTs and a range of uterine cell types (including uterine natural killer (uNK) cells, lymphocytes, macrophages, dendritic cells, and decidual stromal cells).

These interactions have a pivotal role in immune acceptance of the placental/fetal allograft and in the timing and depth of CT invasion. One of the most important strategies appears to be related to the particular pattern of histocompatibility antigens expressed by invasive CTs; in contrast to most somatic cells, CTs lack polymorphic human leukocyte antigen (HLA) class Ia molecules at their surface [33]. Firstly, invasive CTs express the non-classical MHC class IB antigens, including HLA-G (the potent immunosuppressant effects of which have attracted much interest). In fact, soluble HLA-G is able to (i) promote the apoptosis of activated maternal CD8+ T lymphocytes, (ii) prevent maternal CD4+ T lymphocyte proliferation, and (iii) abrogate uNK-cell-mediated cytotoxicity [34].

In summary, CT invasion poses a real challenge in terms of immune modulation during placentation, since as the invasive CTs become exposed to maternal immunocompetent cells in the decidual milieu. The failure of CT invasion is associated with complications of pregnancy (such as abortions and even pre-eclampsia); this is probably due to a premature rise in oxygen levels, which may trigger oxidative stress and damage to placental villi.

A large number of known molecular mediators (including hormones, adhesion molecules, growth factors, lipids, and cytokines) are thought to be involved in this early fetal-maternal interaction. A growing body of evidence suggest that the cytokines leptin and adiponectin exert pleiotropic functions at the fetal-maternal interface. The two adipokines' roles in blastocyst implantation, trophoblast proliferation, differentiation, invasiveness, uterine artery remodeling, nutrient transport, angiogenesis, endometrial receptivity, and fetal-maternal immune tolerance (summarized in Table 1) will be discussed in the following section.

#### Leptin

Various studies in rodents and in humans have suggested that leptin does indeed have a role in reproductive function and, more precisely, in the embryonic-maternal cross-talk at the time of implantation. For example, leptin knock-out mice are sterile but can become fertile if exogenous leptin is administered [9, 35].

In the mouse, leptin is able to promote the development of the implanted embryo. There is also evidence to indicate that human blastocysts co-cultured with endometrial epithelial cells can modulate the secretion of leptin. Competent human blastocyst cultures secrete more leptin than arrested blastocysts do – suggesting that this molecule may be a marker of embryo viability [36]. Moreover, 
 Table 1: Biological effects of leptin and adiponectin on placental and endometrial tissues in humans.

	Leptin	Adiponectin
Placental functions		
Proliferation	+	-
Apoptosis	-	+
Invasion	+	+
Syncytialization	+	±
Angiogenesis	+	±
Amino acid transport	+	-
Inflammation	+	+
Immune tolerance	+	+
Endometrial functions		
Receptivity	±	?
Decidualization	±	?
Angiogenesis	+	?
Inflammation	+	?

This table summarizes the specific roles of leptin and adiponectin in the development of both placental and endometrium tissues, as described in the literature. +, Stimulation; -, inhibition;  $\pm$ , controversial data; ?, unknown effects.

in contrast to maternal leptin levels, umbilical leptin levels are positively correlated with placental weight and a number of markers of fetal growth (including the BMI). Leptin is therefore, also considered to be a marker of fetal adiposity [37].

Furthermore, leptin synthesis and secretion and the expression of functional short and long leptin receptors by CT cells has been well characterized - suggesting that leptin may have a paracrine/autocrine action [38]. Leptin and OB-R are co-localized in ST (which is exposed to maternal blood), in extravillous CT cells, and in fetal vascular endothelial cells (which are in direct contact with fetal blood) [39]. Placental leptin expression starts at the very early stages of gestation (i.e. seven weeks after fertilization) and is closely modulated by pregnancy-related factors [including steroid hormones and human chorionic gonadotropin (hCG)], cytokines, and hypoxia (which occurs during the first steps in placentation) [40]. The placenta has been shown to produce leptin and is even thought to be a major source of circulating leptin during gestation. Consequently, leptin is now considered to be a placental hormone [41]. Furthermore, research performed with ex vivo human placental explants has demonstrated that placental leptin is transported from the fetus to the mother and vice versa [42]. At present, it is not known which receptors mediate this transportation or whether this phenomenon occurs in vivo. However, a recent study found that megalin (which is involved in leptin endocytosis in the kidney) is expressed in the human ST [38]. Hence, one cannot rule out the possibility that megalin transports leptin across the placenta.

Various in vitro studies have demonstrated the importance of leptin's role in placental development. Firstly, Maymó and co-workers demonstrated that leptin stimulates proliferation and decreases the apoptotic index in the human JEG-3 choriocarcinoma cell line and in CTs from human term placenta [38]. The molecular mechanisms by which leptin stimulates cell proliferation are now well characterized. It was observed that leptin directly controls cell cycle progression by inducing the expression of regulators of the G1/S transition (such as the cyclin D1 gene) in trophoblasts [43]. Furthermore, this adipokine not only increases protein synthesis (by activating the translational machinery) but also promotes phosphorylation of the translation initiation factor binding protein EIF4EBP1 in the placenta. Phosphorylation of EIF4EBP1 releases the initiation factor EIF4B and thus initiates the translation process [44]. Researchers have suggested that leptin's activation of this mechanism in placenta may have physiological and pathophysiological relevance, since a decrease in EIF4EBP1 phosphorylation was been recently noted in fetuses with intra-uterine growth restriction (IUGR) due to impaired placental development [40]. Lastly, pharmacological inhibitors have been used to show that leptin's effect on JEG-3 cell growth is completely reversed by blocking MAPK activation. These results suggest that leptin prevents both the early and late events in trophoblast growth via the MAPK pathway [45].

Leptin has also a central role in the developmental regulation of the biochemical, physiological and morphological differentiation of trophoblasts. It has been shown that leptin stimulates the ability of human villous CTs (isolated from normal-term placenta) and the BeWo choriocarcinoma cell line to differentiate into a ST, as reflected by morphological changes and biochemical changes (hCG production) [46]. Leptin exerts its pro-differentiation effect both directly (by activating PKA and p38 MAPK pathways) and indirectly (by regulating estrogen and hCG, two major inducers of syncytialization). A self-regulatory positive feedback loop in the ST involves leptin, estrogens, and hCG [47]. It has also been demonstrated that estrogens enhance leptin expression in placental cells through genomic and non-genomic effects [48].

Various studies report that leptin promotes trophoblast invasion by modulating various trophoblastic growth factors (including IL1 and 17 $\beta$ -estradiol) [49]. In turn, IL1 upregulates leptin secretion in first-trimester CT cultures [50]. Other studies report leptin's ability to stimulate fetal fibronectin (a molecule favoring the migration of the extravillous CTs into the uterine wall) and enhance
**DE GRUYTER** 

trophoblast MMP-2 and MMP-9 secretion – thereby conferring a placenta-invading phenotype [51].

Additional in vitro studies have examined leptin's effect on angiogenesis and have suggested the adipokine's possible involvement in new placental vessel formation. This pro-angiogenic effect of leptin can be explained by the fact that the adipokine induces the expression of VEGF (the key factor in the angiogenic process) and its receptor VEGF-receptor 2 in cultured human trophoblasts [52]. Once activated, VEGF-receptor 2 stimulates the p38 MAPK and PKA pathways. The data suggest that changes in leptin levels may disrupt normal angiogenic events and the remodeling of maternal arteries during placental expansion; this may lead to hyper-activation of the angiogenic pathways and thus endothelial dysfunction.

Furthermore, leptin regulates energy metabolism in placental cells. Leptin has a notable role in the transport of macronutrients in general and amino acids in particular. In term placental explants, leptin has been shown to enhance system A sodium-dependent neutral amino acid transport (SNAT) activity, and therefore, may mediate amino acid delivery to the fetus via the placenta [53]. The importance of SNAT in fetal growth regulation is well proven. Pregnancies complicated by IUGR are associated with low SNAT activity in the microvillous membranes of the ST, which results in poor transfer of maternally derived amino acids to the fetus. Pregnancies complicated by maternal obesity also appear to be associated with dysregulated leptin function. Placental tissue from obese pregnancies has low SNAT activity - even when leptin levels are elevated. These results suggest that in maternal obesity, the development of placental leptin resistance can decrease nutrient availability for the fetus and therefore, may explain the IUGR observed in some obese, pregnant women [2]. There are at least two possible mechanistic explanations for placental leptin resistance: (i) the downregulation of OB-Rb expression in the term ST (frequently observed in obese pregnancies) and (ii) the inactivation of OB-Rb transduction mediated by the overexpression of suppressor of cytokine signaling 3 (a well-known inhibitor of leptin signaling) [2].

Leptin's role in the inflammation process begins in adipose tissue, where leptin has been shown to act as a pro-inflammatory factor by inducing TH1-type cytokine production by monocytes and lymphocytes [54]. The systemic inflammatory response and high circulating levels of leptin in obese women are believed to prime placental inflammation during pregnancy [55]. The resulting placental inflammation is reflected by the secretion of pro-inflammatory cytokines (such as IL-1 and TNF $\alpha$ ) by activated macrophages in the placental stromal layer [56]. Furthermore, a recent in vitro study revealed that leptin also participates in the innate and adaptive immunity of trophoblast cells. More precisely, leptin was found to induce trophoblast HLA-G expression by activating MAPK and PI3K signaling cascades [57]. Given HLA-G's well-known immunosuppressive properties, the researchers considered that placental leptin is an endogenous, protective component of the differentiation machinery of trophoblast cells – conferring them with a tolerogenic phenotype that prevents immune damage as they invade maternal tissues during the early stages of pregnancy.

Although data from humans are scarce, Ruchat and co-workers recently provided insights into the potential importance of leptin epigenetic changes in fetal metabolic programming [58]. Their work clearly demonstrated that the leptin gene's DNA methylation level varies according to the site within the placenta; methylation levels are lower on the maternal side of the placenta than on the fetal side. The researchers suggest that differences in methylation could explain (at least in part) the link between early exposure to a detrimental fetal environment and an increased risk of developing obesity and diabetes later in life. This example illustrates the complexity of placental tissue, which undergoes constant change during pregnancy. When seeking to better understand the molecular mechanisms in placental physiology, it is therefore, very important to specify the term and the cell types in each placental study.

Taken as a whole, these results suggest that leptin acts directly as a critical "placental hormone" in the control of human placental growth, development, and functions. Accordingly, leptin is now commonly used as a biochemical marker of trophoblast differentiation.

#### Adiponectin

Relative to leptin, there are fewer literature data on adiponectin's involvement in reproduction and its actions at the fetal-maternal interface. Animal experiments have revealed that adiponectin knock-out mice are fertile [59] but that transgenic mice overexpressing adiponectin are sterile [60].

Furthermore, some studies have reported on the potential use of circulating maternal adiponectin levels as a fertility marker; more precisely, high adiponectin levels are associated with successful in vitro fertilization [61, 62].

Although earlier reports suggested that adiponectin was produced by the human placenta, more recent studies (including our published data) clearly show that this adipokine is only secreted by the endometrium [63, 64]. Hence, any adiponectin at the fetal-maternal interface comes from the endometrium and (to a lesser extent) maternal blood. Adiponectin is found at the fetal-maternal interface very early in pregnancy (when remodeling of the spiral arteries occurs). Lastly, the presence of adiponectin at the fetal-maternal barrier is relayed by its production and secretion by fetal tissue [65]. In fact, the concentrations of adiponectin in umbilical cord plasma and neonatal plasma are four times and two to three times higher than in plasma from adults [66]. The adiponectinproducing tissues have not been well characterized in newborns. However, the expression of adiponectin in fetal white adipose tissue and vascular cells probably contributes to the high observed circulating concentrations at birth [65]. One possible explanation relates to the fact that fetal and neonatal adipose tissues are essentially subcutaneous (composed of small adipocytes). It is well known that hypotrophic adipocytes from subcutaneous adipose tissue possess a greater ability to secrete adiponectin than visceral, hypertrophic adipose cells do [67]. In contrast to their ligand, AdipoR1 and AdipoR2 are expressed in human placenta - suggesting that adiponectin has an endo/paracrine action at the fetal-maternal interface [68].

To date, very few studies have demonstrated a direct role of adiponectin during the pre-implantation period and the first steps in placental development. In human first-trimester placenta, we clearly demonstrated that adiponectin not only attenuates trophoblastic growth but also enhances CT invasiveness by increasing the activity of MMP2 and MMP9 [64, 68, 69].

Furthermore, it has been demonstrated that adiponectin promotes the syncytialization potential of human first-trimester CTs (as reflected by elevated hCG secretion and the upregulation of the trophoblast differentiation markers leptin and syncytin 2 via the PKA transduction pathway) [64]. Conversely, in human term placenta, a study revealed that adiponectin treatment of primary CTs attenuated their endocrine function (with a significant drop in the expression of hCG, placental lactogen, and steroidogenic enzymes such as p450-aromatase) [70]. These observations suggest that adiponectin exerts gestational-age-dependent effects in human placenta, as already described for epidermal growth factor [71].

Surprisingly, chronic administration of adiponectin to pregnant mice inhibits placental insulin signaling, downregulates the activity and expression of key placental nutrient transporters, and slows fetal growth [72]. In vitro experiments performed on primary human trophoblast cells from term placenta showed that fAD attenuates insulin-stimulated SNAT by stimulating the inhibitory p38 MAPK pathway and PPAR $\alpha$ -mediated ceramide synthesis and thus modulating insulin receptor substrate phosphorylation [72, 73]. These recent data contrast with adiponectin's well-characterized insulin-sensitizing actions in liver and muscle. One possible explanation for these discrepancies relates to the fact that a novel isoform of the receptor adaptor protein APPL2 was found to suppress adiponectin signaling by sequestering APPL1 [74]. Thus, one can speculate that placenta vs. muscle differences in the expression and/or function of both APPL1 and APPL2 result in dissimilar responses to adiponectin.

Furthermore, adiponectin has an immunomodulatory effect; the adipokine induces the CD24/Sigle C10 pathway in the human term ST [75]. CD24 and Sigle C10 are both located on the cell surface and are involved in the marked downregulation of the maternal immune response to fetal antigens [76]. By upregulating CD24/Sigle C10 expression, adiponectin might therefore, prompt trophoblast cells to evade the maternal immune system and thus favor maternal immune tolerance of the fetus.

Conflicting results have been reported with regard to adiponectin's effects on angiogenesis. Ouchi and co-workers showed that this adipokine enhances the differentiation of human umbilical vein endothelial cells into capillary-like structures and promotes blood vessel growth in vivo [77]. In the contrast, other researchers reported that adiponectin had an "anti-endothelial action" [78]. It is therefore, difficult to draw definite conclusions about adiponectin's role in angiogenesis during early placentation.

Lastly, adiponectin reportedly stimulates production of the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 and TNF $\alpha$ , and the prostaglandin PGE<sub>2</sub> in term human placental explants [79, 75]. The researchers suggested that adiponectin may be involved in the processes of labor and delivery in vivo, since the release of prostaglandins and pro-inflammatory cytokines within the intra-uterine environment regulates myometrial contractility, cervical ripening, and rupture of membranes [80].

Above, we described the roles of leptin and adiponectin in placental physiology. In the following section, we go on to describe the adipokines' roles in the development of the endometrium – the second component of the fetalmaternal interface.

# Adipokines and the endometrium

Embryo implantation is an absolute requirement for reproduction. It starts with blastocyst apposition to the uterine endometrium and continues with blastocyst attachment to the endometrial epithelium. Implantation can only take place in a receptive uterus. In humans, the uterus is only receptive in a temporally and spatially restricted window of implantation (WOI), corresponding to the mid-secretory phase (days 20-24) of the menstrual cycle [81]. Uterine receptivity develops in response to ovarian steroid hormones (mainly progesterone) and conceptus factors [82]. Furthermore, endometrial receptivity is characterized by morphological, biochemical and vascular modifications at the implantation site, including (i) the appearance of epithelial dome-like structures (pinopodes), (ii) modulated expression of various cytokines, chemokines, growth factors and adhesion molecules (particularly the upregulation of epithelial  $\alpha$ V- and  $\beta$ 3integrins), (iii) disappearance of the epithelium's antiadhesive molecular surface (i.e. mucin 1 and mucin 12), and (iv) decidualization of stromal endometrial cells [83]. Decidualization involves the transformation of fibroblastlike endometrial stromal cells into larger, more rounded decidual cells, and is accompanied by the secretion of specific markers (such as prolactin and insulin growth factor binding protein 1) [84].

Some reports have clearly described an alteration in endometrial receptivity in obese women during the WOI. Two studies of donated oocytes reached similar conclusions. More precisely, women with a BMI  $>30 \text{ kg/m}^2$  presented significantly lower pregnancy rates than normal-weight women [85]. Bellver and co-workers demonstrated that genes related to biological process such as development, morphogenesis, and the immune system were dysregulated in the endometrium of obese women [86]. Other studies have shown that endometrial biopsy taken during the spontaneous cycle preceding in vitro fertilization and embryo transfer improves by approximately a factor of two the rate of implantation, clinical pregnancies, and live births [87]. Taken together, these reports suggest that successful implantation results from the development of an injury-induced inflammatory reaction. By producing the interleukins (IL-8, IL-15, etc.) and angiogenic factors that are essential for the establishment of an adequate decidua, decidual uNK cells have a pivotal role in regulating trophoblast invasion [78]. Moreover, dendritic cells and macrophages create an inflammatory gradient in the uterine stroma, which favors blastocyst attachment to a specific area of the uterus. There are at least four possible ways in which blastocyst binding to the endometrial epithelium may be enhanced by cytokines/chemokines secreted by these immune cells: (i) local degradation of the anti-adhesive mucin layer at the epithelial surface, (ii) changes in the expression of adhesion molecules, (iii) reorganization of the epithelial desmosome junction, and

(iv) formation of pinopodes on the epithelial surface [88]. This immune infiltration has a crucial role in the development of a receptive endometrium. The recruitment of immune system cells to the site of injury may create a "tissue memory" that facilitates embryo implantation. Monocyte precursors of macrophages and dendritic cells are indeed known to be long-lived and reside in some tissues for months [89].

#### Leptin

A growing body of evidence suggests that leptin signaling is essential for the acquisition of endometrial receptivity. Firstly, leptin upregulates the expression of  $\alpha V$  and  $\beta 3$ integrin subunits (the two major biomarkers of receptivity) in human endometrial epithelial cells [90, 91]. Secondly, leptin promotes endometrial epithelial cell adhesion to fibronectin, collagen, and laminin. Furthermore, leptin's pleiotropic actions in the endometrium are associated with elevated levels of pro-angiogenic and inflammatory cytokines (i.e. VEGF, IL-1, and leukemia inhibitor factor) and their cognate receptors [92]. It has been demonstrated that leptin exerts these effects by (i) stimulating the JAK2/ STAT3, MAPK, and PI3K transduction pathways [93] and (ii) activating uNK cells, which produce an array of angiogenic growth factors (including angiopoietins-1 and -2, and VEGF). Hence, leptin is directly involved in decidual vascular remodeling and neovasculogenesis [93]. In contrast, an excessively high serum leptin concentration has harmful effects on endometrial receptivity. A recent study reported that high leptin concentrations (as observed in obese women) significantly downregulate the expression of the epithelial sodium channel in endometrium during the WOI [94]. These ion channels are responsible for the disappearance of the uterine fluid, and the absence results in poor endometrial receptivity and/or implantation failure [95].

Leptin also stimulates endometrial decidualization, as reflected by an increase in the expression and secretion of the major endometrial differentiation markers (such as prolactin) in rat endometrial stromal cells [96]. These findings contrast with the study by Tanaka and coworkers, who reported that leptin has a negative effect on prolactin secretion in cultured human endometrial stromal cells [97]. The researchers suggested that these discrepancies may be due to differences in the species used and/ or the experimental methodology. Further experiments will be required to clarify this point and to gain a better understanding of the molecular mechanisms that underlie leptin's effects on decidualization.

In human endometrium, OB-R levels are greatest during the WOI [98]. Wang and coworkers demonstrated that endometrium OB-R expression is low during the WOI in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS) or endometriosis [99, 100]. These results suggest that (i) OB-R expression may be regulated at critical times in the peri- and post-implantation periods and (ii) abnormal expression may occur in certain etiologies of infertility. A study performed in our laboratory clearly demonstrated that leptin expression was significantly attenuated in the endometrium of women with unexplained recurrent implantation failure, relative to a fertile group [101]. Conversely, OB-R expression was higher in infertile women than in controls. As already observed in different tissues, downregulation of OB-R expression by leptin itself has been suggested. These results indicate that changes in leptin and OB-R expression profiles in human endometrium are involved in the development of uterine receptivity and may therefore, be new markers for the prediction of implantation failure.

#### Adiponectin

Little is known about the role of adiponectin in human endometrium. It has been demonstrated that adiponectin and its receptors are expressed in the human uterus [102]. Another study evidenced high AdipoR expression during the luteal period, which corresponds to the embryo implantation period [102]. Recent experiments performed in our laboratory indicate that the adiponectin system is involved in unexplained, recurrent implantation failure; although adiponectin was expressed to the same extent in fertile and infertile women, the endometrial expression of both AdipoR1 and AdipoR2 was lower in infertile women than in the control group [101]. These results strongly suggest a role for adiponectin in human uterine receptivity.

Another study reveal that adiponectin decreases the viability of human endometrial stromal cells in a doseand time-dependent manner [103]. This confirmed Cong and coworkers' findings with regard to adiponectin's inhibitory effect on endometrial carcinoma cell lines (HEC-1-A and RL95-2) [104].

In summary, a number of in vivo and in vitro studies have revealed that leptin and adiponectin are involved in the development of a functional placenta (as characterized by secretory and endometrial-anchoring capacities) and a functional uterus (as reflected by adequate endometrial receptivity). These two adipokines should be considered as favorable factors for human embryo implantation.

# Adipokines and pregnancyassociated pathologies

#### Normal pregnancies

Major changes in plasma leptin levels occur during pregnancy. Circulating leptin concentrations increase significantly and reach a peak during the second trimester and at the end of pregnancy. Immediately after delivery, maternal plasma leptin levels return to normal values. Human placenta expresses high amounts of leptin mRNA and protein in early, mid-, and late gestation [105]. The origin of the pregnancy-induced rise in leptin is now well understood. There is much evidence to suggest that placental tissue (rather than maternal adipose tissue) makes a substantial contribution to this rise. Firstly, the leptin increase precedes the physiological increase in maternal BMI at the end of the second trimester [106]. Secondly, circulating leptin levels decline rapidly after delivery in the mother. Thirdly, cross-sectional studies of leptin mRNA expressions in white adipose tissue from pregnant and non-pregnant women suggest that adipose tissue leptin makes little contribution to the plasma rise because the mRNA content does not increase in early pregnancy [107]. Furthermore, it has been reported that the increase in maternal leptinemia and placental synthesis also occurs in molar pregnancies and in pregnancies associated with choriocarcinoma [41]. In both cases, maternal leptinemia decreases after uterine evacuation, which is in line with the evidence that leptin produced by the placenta is released into the systemic circulation (thus contributing to the elevated maternal levels observed during pregnancy) [41].

Concerning adiponectin, researchers have attempted to evaluate whether changes in the levels of this adipokine occur during pregnancy. A large body of evidence shows that adiponectin concentrations fall slightly during the second half of pregnancy and suggests that pregnancyrelated molecules are able to modulate adipokine secretion [108]. Given that adiponectin increases insulin sensitivity, it has been proposed that the decreased adiponectin concentrations observed during pregnancy may contribute to the physiological loss of maternal insulin sensitivity.

Major perturbations in maternal leptin and adiponectin concentrations have been described in some pathologies of the female reproductive system, such as gestational diabetes mellitus, pre-eclampsia, PCOS, IUGR, endometriosis, implantation failure, and unexplained RSA. These data are summarized in Table 2. **Table 2:** Levels of leptin and adiponectin in different reproductive pathologies in women.

Reproductive pathology	Leptin levels	Adiponectin levels
Gestational diabetes mellitus	1	7
Pre-eclampsia	1	Controversial
Polycystic ovarian syndrome	1	$\mathbf{V}$
Intra-uterine growth restriction	7	Controversial
Endometriosis	1	$\mathbf{V}$
Unexplained recurrent spontaneous abortion	Controversial	?
Implantation failure	?	?

The table summarizes the literature data on serum leptin and adiponectin levels in some gynecological conditions and complications of pregnancy in women.  $\nearrow$ , Elevation;  $\searrow$ , reduction; ?, unknown effects.

#### **Gestational diabetes mellitus**

Gestational diabetes mellitus is the most frequent metabolic disorder in pregnancy, with an incidence of between 1% and 10% [109]. The disease is characterized by impaired glucose tolerance and develops when the pancreatic  $\beta$ -cell reserve is too small to compensate for the pregnancy-related decrease in insulin sensitivity. Women with gestational diabetes have lower circulating adiponectin concentrations than patients with a normal pregnancy (independently of pre-pregnancy BMI and insulin sensitivity) [110]. Furthermore, Lain and co-workers clearly demonstrated that women with firsttrimester adiponectin concentrations below the 25th percentile are ten times more likely to be diagnosed with gestational diabetes mellitus than women with higher adiponectin levels [111]. Conversely, hyperleptinemia is observed in pregnancies with gestational diabetes [112]. An abnormally high level of maternal leptin in early pregnancy has even been shown to be predictive of an increased risk of gestational diabetes later in pregnancy [113]. The physiological relevance of pregnancyassociated hyperleptinemia is not fully understood. It is known that elevated levels of maternal leptin are associated with a state of central resistance, which may favor energy accumulation during gestation and thus the maintenance of placental growth, fetal energy demands, and preparation for maternal lactation. In rats, it has been demonstrated that central leptin resistance is due to downregulation of OB-Rb in the brain [114].

Furthermore, fetuses of diabetic mothers exhibit significantly lower circulating adiponectin levels and higher leptin levels than normal fetuses of the same gestational age (independently of the birth weight) [115, 116]. Thus, these findings indicate that maternal leptin and adiponectin are modulators of gestational diabetes.

Lastly, a recent study clearly demonstrated an association between gestational diabetes mellitus and the newborn's epigenomic profile. More precisely, Bouchard and co-workers found that leptin and adiponectin DNA methylation levels are dysregulated in placentas exposed to maternal hyperglycemia. On the fetal side of the placental tissue, the leptin and adiponectin genes were hypomethylated. On the maternal side of the placental tissue, the adiponectin gene was hypomethylated and the leptin gene was hyper-methylated [58]. The researchers hypothesized that these epigenetic modifications may have been induced to partially counterbalance the effects of maternal hyperinsulinemia on the regulation of gene expression.

#### Pre-eclampsia

Like gestational diabetes, pre-eclampsia shares risk factors with metabolic syndrome (including insulin resistance, inflammation, and obesity). Pre-eclampsia is a multisystem disorder characterized by the de novo, concomitant development of hypertension and proteinuria. It is a major contributor to fetal, neonatal and maternal morbidity and mortality [117]. Although the etiology of pre-eclampsia has not been characterized, it has been suggested that pre-eclampsia starts with inadequate trophoblastic invasion, failure of uterine spiral artery remodeling, and thus placental ischemia [118]. Significantly elevated leptin levels are observed in pregnancies complicated by pre-eclampsia, and this elevation is proportional to the severity of the pathology [116]. Elevated maternal leptin concentrations is accompanied by significant placental upregulation of leptin expression, which in turn result in hypomethylation of the *Ob* gene [119]. Furthermore, genetic studies show that the G-G haplotype of leptin receptor gene polymorphism Lys109Arg and Gln223Arg is significantly more frequent in severely pre-eclamptic patients than in controls [120].

Data on plasma adiponectin levels are subject to debate. Indeed, some studies have evidenced abnormally low reduced adiponectin concentrations in women with pre-eclampsia [121]. Furthermore, two studies report that hypo-adiponectinemia and pre-eclampsia are only correlated when obesity and gestational diabetes are present as complicating factors [122, 123]. Other studies did not observe any significant differences in adiponectin levels when comparing pre-eclamptic and control pregnancies [124, 125]. Lastly, a paradoxical, marked increase in circulating adiponectin was described [126]. The reasons for these conflicting results are still unclear. However, inter-study differences in the definition of pre-eclampsia and in the patients' ethnic background, BMI, and smoking habits might contribute to these discrepancies. There is also genomic evidence that pre-eclampsia is associated with a G276T single nucleotide polymorphism in intron 2 of the adiponectin gene; this may have particular relevance [127]. Hence, additional studies are needed in order to determine whether or not first-trimester hypo-adiponectinemia is truly associated with pre-eclampsia.

#### Polycystic ovarian syndrome

PCOS is a common, heterogeneous, endocrine disorder characterized by hyper-androgenism, chronic anovulation, and polycystic ovaries. It affecting between 5% and 10% of women of childbearing age [128]. Obesity is often observed in about 50% of patients with PCOS. However, low adiponectin levels and high leptin levels are observed in both obese and non-obese women with PCOS [129, 130]. It has been shown that high concentrations of leptin in serum are associated with an inhibition of leptin signaling, since a significant reduction of STAT3 phosphorylation is observed in granulosa cells from women with PCOS [127]. The researchers suggested that these factors may contribute to infertility in PCOS. Moreover, genetic investigations revealed that variants of the adiponectin gene (a single T45G nucleotide polymorphism in exon 2) are more prevalent in women with PCOS [131].

Lastly, the pathological role of adiponectin and leptin in PCOS appears to be mediated by the adipokines' capacity to directly influence ovarian function. Indeed, both adiponectin and leptin have been shown to regulate the gonadotropic axis centrally by modulating kisspeptin neurosecretion [26, 114]. The involvement of kiss1 neurons in PCOS is presently being investigated.

#### Intra-uterine growth restriction

Given the importance of glucose and insulin in fetal growth and the fundamental roles of leptin and adiponectin in energy metabolism, it is reasonable to assume that both adipokines have a regulatory role in IUGR [132]. It has been shown that IUGR fetuses adapt their metabolism to gain short-term benefit. For example, fetuses are able to shift their adiponectin pattern toward the HMW isoform (which specifically correlates with insulin sensitivity), in order to sensitize the body to insulin and prepare for neonatal catch-up [133]. In contrast, abnormally low adiponectin concentrations have been recorded in IUGR fetuses; it has been suggested that this downregulation predisposes the fetus to the subsequent development of insulin resistance and metabolic syndrome [134]. In contrast, normal and elevated adiponectin concentrations have been reported in insulin-resistant children having suffered IUGR [135]. One possible explanation for these contradictory results relates to the fact that IUGR was not characterized in the same way in the above-mentioned studies. Alternatively, these discrepancies might primarily results from specific methodological differences between studies. Taken as a whole, these data suggest that adiponectin deficiency is a plausible, attractive explanation for the metabolic abnormalities observed in IUGR children.

Blood leptin levels are lower in women with IUGR than in healthy women [136, 137]. Neonatal and umbilical cord blood leptin levels are also lower in cases of IUGR [138]. These findings confirm that leptin is a marker of fetal adiposity and that fetal adipose tissue is a source of leptin [139].

#### Endometriosis

Although endometriosis is the most common gynecological disorder, relatively little is known about its etiology. The abnormal production of leptin by endometrial cells is one possible biochemical cause. Over-secretion of leptin by endometriotic cells is observed and thus might contribute to the progression of endometriosis by upregulating the secretion of inflammatory and angiogenic cytokines, and matrix metalloproteinases [140]. Moreover, serum adiponectin concentrations are abnormally low in women with endometriosis [141]. Researchers have even suggested that adiponectin is an anti-endometriotic factor (in view of its anti-inflammatory, anti-angiogenic, and antifibrotic properties).

#### Unexplained recurrent spontaneous abortion

It is estimated that 0.5%–1% of women suffer from RSA (commonly defined as at least three consecutive pregnancy losses before 20th week of gestation and with the same partner). In most cases, miscarriage is associated with abnormal development of the fetoplacental unit.

Leptin's role in RSA is subject to debate. Two studies found that first-trimester serum leptin levels were lower in women with a history of RSA than in normal women when blood samples were taken (i) within 24 h of the abortion or (ii) at weeks 5-6 and 7-8 of pregnancy [142, 143]. However, there was considerable overlap between leptin concentrations in women who subsequently miscarried and those that did not; hence, the researchers suggested that leptin measurements are of limited use for predicting the outcome of pregnancy. Another first-trimester study did not evidence any differences in maternal serum leptin concentrations when comparing pregnancies with delayed miscarriage and pregnancies with live births [144]. Lastly, two later studies clearly demonstrated that serum leptin concentrations were higher in women with unexplained infertility than in fertile subjects when cytokine levels were measured (i) during the early follicular phase of the menstrual cycle (day 3) and (ii) during the first trimester of pregnancy [145, 146].

Much less is known about adiponectin's involvement in RSA. A single, recent study of a non-obese population in northern Indian has highlighted the role of adiponectin polymorphisms in recurrent miscarriage; more precisely, two single-nucleotide adiponectin polymorphisms (276 G/T in intron 2 and 45 T/G in exon 2) were associated with a significantly greater risk of RSA [147].

#### **Recurrent implantation failure**

Repeated, unexplained implantation failure is defined as the absence of pregnancy after the transfer of 10 or more normal embryos (fresh or freeze-thawed) over several in vitro fecundation cycles. There are many putative causes of implantation failure; these notably include maternal factors such as uterine abnormalities, hormonal and metabolic disorders, infections, and immunological factors. Recently, researchers have attempted to identify specific biomarkers of this complex pathology [87]. Infertile women with repeated implantation failure have high levels of antibodies against the placental-specific protein PLAC1 (relative to controls) [148]. If these preliminary data are confirmed, anti-PLAC1 antibodies may constitute a good biomarker of infertility and a high probability of recurrent implantation failure.

To the best of our knowledge, serum levels of leptin and adiponectin have not been studied in women with recurrent implantation failure. We are currently investigating this topic in the laboratory. In parallel, human transcriptomic and proteomic methods offer attractive new ways of investigating the expression and secretion of various biologically active factors that favor endometrial receptivity and thus embryo implantation. However, these techniques have a long way to go before they can be implemented in clinical practice.

In summary, the aberrant secretion of leptin and adiponectin has now been described in the most frequent reproductive pathologies (such as diabetes, pre-eclampsia, PCOS, endometriosis and RSA) and in the context of poor fetal growth. Additional research is required to specify the putative involvement of leptin and adiponectin in other reproductive complications.

# **Conclusion and perspectives**

Since the discovery of leptin and adiponectin and their initial association with appetite and insulin sensibility, respectively, it is now clear that these "fat hormones" also have important roles in reproductive biology. The present review summarized current knowledge on leptin and adiponectin's involvement in the physiology of pregnancy. Both adipokines are now known to have a wide range of important roles, ranging from maternal physiology to embryo implantation and from endo/para/autocrine effects at the fetal-maternal interface to the regulation of conceptus development and fetal growth. As discussed above, the opposing actions of leptin and adiponectin have been widely studied with regard to various biological functions such as cell proliferation, angiogenesis, and inflammation processes. Both adiponectin and leptin circulate in the blood. Many recent studies have emphasized that it is important to consider not only the separate effects of each adipokine or leptin but also the ratio between these two adipokines. Indeed, a growing body of evidence suggests that the leptin-adiponectin ratio can serve as a clinically useful marker for certain human pathologies. For example, the leptin-adiponectin ratio appears to be a good candidate for predicting future insulin resistance, atherosclerosis, metabolic syndrome and perhaps even cardiovascular disease in high risk subjects [149, 150]. Other studies have emphasized that lower leptin-adiponectin ratios were significantly associated with an increased risk of hormonal cancers (such as endometrial, prostate and breast cancers) [151–153]. In breast cancer, the leptin-adiponectin ratio is even correlated with tumor size and tumor aggressiveness [154]. Lastly, a recent study performed in women undergoing assisted reproduction revealed a positive association between follicular fluid adipokine levels on one

hand and oocyte quality and in vitro embryo development on the other. More precisely, oocytes from women with a high follicular leptin-adiponectin ratio were more likely to undergo successful cleavage and viable morphology than those from women with a low ratio [155]. These results are the first to illustrate a positive effect of a high leptinadiponectin ratio.

In conclusion, the above observations suggest that not only the balance between adiponectin and leptin but also the relationships with other cytokines (IL-18, TNF $\alpha$ , leukemia inhibitor factor, etc.) must be considered in the complex endo/para/autocrine regulation of human reproduction in general and the first steps of pregnancy in particular. Hence, further investigation is clearly needed to specify the respective roles of leptin and adiponectin within this cytokine network.

**Acknowledgments:** We sincerely thank Hadia Moindjie and Fabien Duval, our two Ph.D. students, for their invaluable editorial assistance.

# References

- 1. Reverchon M, Ramé C, Bertoldo M, Dupont J. Adipokines and the female reproductive tract. Int J Endocrinol 2014;2014:232454.
- 2. Tessier DR, Ferraro ZM, Gruslin A. Role of leptin in pregnancy: consequences of maternal obesity. Placenta 2013;34:205–11.
- 3. Talmor A, Dunphy B. Female obesity and infertility. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2015;29:498–506.
- Ross MG, Desai M. Developmental programming of appetite/ satiety. Ann Nutr Metab 2014;64(Suppl 1):36–44.
- Desai M, Jellyman JK, Ross MG. Epigenomics, gestational programming and risk of metabolic syndrome. Int J Obes 2005 2015;39:633-41.
- Jeve YB, Konje JC, Doshani A. Placental dysfunction in obese women and antenatal surveillance strategies. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2015;29:350–64.
- Bellver J, Martínez-Conejero JA, Labarta E, Alamá P, Melo MA, Remohí J, Pellicer A, Horcajadas JA. Endometrial gene expression in the window of implantation is altered in obese women especially in association with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 2011;95:2335–41, 2341.e1–8.
- AlSaif S, Mumtaz S, Wray S. A short review of adipokines, smooth muscle and uterine contractility. Life Sci 2015;125:2–8.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature 1994;372:425–32.
- Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallon, R, Ranganathan S. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. Nat Med 1995;1:1155–61.
- Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, Hill RA. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. Int J Obes Relat Metab Disord J Int Assoc Study Obes 2002;26:1407–33.

- 12. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. Nature 1998;395:763–70.
- Bjørbaek C, Uotani S, da Silva B, Flier JS. Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. J Biol Chem 1997;272:32686–95.
- Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). Biochem Biophys Res Commun 1996;221:286–9.
- Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. J Biol Chem 1995;270:26746–9.
- Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T, Tomita M. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. J Biochem (Tokyo) 1996;120:803–12.
- 17. Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. Endocr Rev 2005;26:439–51.
- Kobayashi H, Ouchi N, Kihara S, Walsh K, Kumada M, Abe Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin. Circ Res 2004;94:e27–31.
- Hada Y, Yamauchi T, Waki H, Tsuchida A, Hara K, Yago H, Miyazaki O, Ebinuma H, Kadowaki T. Selective purification and characterization of adiponectin multimer species from human plasma. Biochem Biophys Res Commun 2007;356:487–93.
- 20. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. Nature 2003;423:762–9.
- 21. Deepa SS, Dong LQ. APPL1: role in adiponectin signaling and beyond. Am J Physiol Endocrinol Metab 2009;296:E22–36.
- Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. Nat Rev Immunol 2006;6:772–83.
- Ceddia RB, Somwar R, Maida A, Fang X, Bikopoulos G, Sweeney G. Globular adiponectin increases GLUT4 translocation and glucose uptake but reduces glycogen synthesis in rat skeletal muscle cells. Diabetologia 2005;48:132–9.
- 24. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo, K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. Nat Med 2001;7:941–6.
- 25. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. Nat Med 2002;8:1288–95.
- Dos Santos E, Pecquery R, de Mazancourt P, Dieudonné M-N. Adiponectin and reproduction. Vitam Horm 2012;90:187–209.
- Peake PW, Shen Y, Walther A, Charlesworth JA. Adiponectin binds C1q and activates the classical pathway of complement. Biochem Biophys Res Commun 2008;367:560–5.

Brought to you by | Stockholms Universitet Authenticated Download Date | 11/3/15 10:05 AM

- Adya R, Tan BK, Randeva HS. Differential effects of leptin and adiponectin in endothelial angiogenesis. J Diabetes Res 2015;2015:648239.
- Tarrade A, Panchenko P, Junien C, Gabory A. Placental contribution to nutritional programming of health and diseases: epigenetics and sexual dimorphism. J Exp Biol 2015;218(Pt 1):50–8.
- Aplin JD. Developmental cell biology of human villous trophoblast: current research problems. Int J Dev Biol 2010;54:323–9.
- 31. Knöfler M, Pollheimer J. Human placental trophoblast invasion and differentiation: a particular focus on Wnt signaling. Front Genet 2013;4:190.
- Burton GJ, Jauniaux E, Charnock-Jones DS. The influence of the intrauterine environment on human placental development. Int J Dev Biol 2010;54:303–12.
- Le Bouteiller P, Legrand-Abravanel F, Solier C. Soluble HLA-G1 at the materno-foetal interface–a review. Placenta 2003; 24(Suppl A):S10–5.
- 34. Kanellopoulos-Langevin C, Caucheteux SM, Verbeke P, Ojcius DM. Tolerance of the fetus by the maternal immune system: role of inflammatory mediators at the feto-maternal interface. Reprod Biol Endocrinol RBE 2003;1:121.
- 35. Chehab FF, Lim ME, Lu R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. Nat Genet 1996;12:318–20.
- González RR, Simón C, Caballero-Campo P, Norman R, Chardonnens D, Devoto L, Bischof P. Leptin and reproduction. Hum Reprod Update 2000;6:290–300.
- Tamura T, Goldenberg RL, Johnston KE, Cliver SP. Serum leptin concentrations during pregnancy and their relationship to fetal growth. Obstet Gynecol 1998;91:389–95.
- 38. Maymó JL, Pérez Pérez A, Gambino Y, Calvo JC, Sánchez-Margalet V, Varone CL. Review: Leptin gene expression in the placenta-regulation of a key hormone in trophoblast proliferation and survival. Placenta 2011;32(Suppl 2):S146–53.
- 39. D'Ippolito S, Tersigni C, Scambia G, Di Simone N. Adipokines, an adipose tissue and placental product with biological functions during pregnancy. BioFactors Oxf Engl 2012;38:14–23.
- Pérez-Pérez A, Sánchez-Jiménez F, Maymó J, Dueñas JL, Varone C, Sánchez-Margalet V. Role of leptin in female reproduction. Clin Chem Lab Med 2015;53:15–28.
- Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. Nat Med 1997;3: 1029–33.
- 42. Hoggard N, Crabtree J, Allstaff S, Abramovich DR, Haggarty P. Leptin secretion to both the maternal and fetal circulation in the ex vivo perfused human term placenta. Placenta 2001;22:347–52.
- Magariños MP, Sánchez-Margalet V, Kotler M, Calvo JC, Varone CL. Leptin promotes cell proliferation and survival of trophoblastic cells. Biol Reprod 2007;76:203–10.
- 44. Pérez-Pérez A, Maymó J, Gambino Y, Dueñas JL, Goberna R, Varone C, Sánchez-Margalet V. Leptin stimulates protein synthesis-activating translation machinery in human trophoblastic cells. Biol Reprod 2009;81:826–32.
- Magariños MP, Sánchez-Margalet V, Kotler M, Calvo JC, Varone CL. Leptin promotes cell proliferation and survival of trophoblastic cells. Biol Reprod 2007;76:203–10.
- 46. Ge YC, Li JN, Ni XT, Guo CM, Wang WS, Duan T, Sun K. Cross talk between cAMP and p38 MAPK pathways in the induction of

leptin by hCG in human placental syncytiotrophoblasts. Reprod Camb Engl 2011;142:369–75.

- 47. Islami D, Bischof P, Chardonnens D. Modulation of placental vascular endothelial growth factor by leptin and hCG. Mol Hum Reprod 2003;9:395–8.
- 48. Gambino YP, Maymó JL, Pérez Pérez A, Calvo JC, Sánchez-Margalet V, Varone CL. Elsevier Trophoblast Research Award lecture: Molecular mechanisms underlying estrogen functions in trophoblastic cells–focus on leptin expression. Placenta 2012;33(Suppl):S63–70.
- 49. Gonzalez RR, Devoto L, Campana A, Bischof P. Effects of leptin, interleukin-1alpha, interleukin-6, and transforming growth factor-beta on markers of trophoblast invasive phenotype: integrins and metalloproteinases. Endocrine 2001;15:157–64.
- Fontana VA, Sanchez M, Cebral E, Calvo JC. Interleukin-1 beta regulates metalloproteinase activity and leptin secretion in a cytotrophoblast model. Biocell Off J Soc Latinoam Microsc Electron Al 2010;34:37–43.
- Castellucci M, De Matteis R, Meisser A, Cancello R, Monsurrò V, Islami D, Sarzani R, Marzioni D, Cinti S, Bischof P. Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases: possible implications for trophoblast invasion. Mol Hum Reprod 2000;6:951–8.
- Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, García-Cardeña G, Papapetropoulos A, Sessa WC, Madge LA, Schechner JS, Schwabb MB, Polverini PJ, Flores-Riveros JR. Biological action of leptin as an angiogenic factor. Science 1998;281:1683–6.
- 53. Farley DM, Choi J, Dudley DJ, Li C, Jenkins SL, Myatt L, Nathanielsz PW. Placental amino acid transport and placental leptin resistance in pregnancies complicated by maternal obesity. Placenta 2010;31:718–24.
- 54. Youssef DM, Elbehidy RM, Shokry DM, Elbehidy EM. The influence of leptin on Th1/Th2 balance in obese children with asthma. J Bras Pneumol 2013;39:562–8.
- 55. Michalakis K, Mintziori G, Kaprara A, Tarlatzis BC, Goulis DG. The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: a narrative review. Metabolism 2013;62:457–78.
- Mrizak I, Grissa O, Henault B, Fekih M, Bouslema A, Boumaiza I, Zaouali M, Tabka Z, Khan NA. Placental infiltration of inflammatory markers in gestational diabetic women. Gen Physiol Biophys 2014;33:169–76.
- 57. Barrientos G, Toro A, Moschansky P, Cohen M, Garcia MG, Rose M, Maskin B, Sánchez-Margalet V, Blois SM, Varone CL. Leptin promotes HLA-G expression on placental trophoblasts via the MEK/Erk and PI3K signaling pathways. Placenta 2015;36:419–26.
- Ruchat S-M, Hivert M-F, Bouchard L. Epigenetic programming of obesity and diabetes by in utero exposure to gestational diabetes mellitus. Nutr Rev 2013;71(Suppl 1):S88–94.
- 59. Campos DB, Palin M-F, Bordignon V, Murphy BD. The "beneficial" adipokines in reproduction and fertility. Int J Obes 2005 2008;32:223–31.
- 60. Combs TP, Pajvani UB, Berg AH, Lin Y, Jelicks LA, Laplante M, Nawrocki AR, Rajala MW, Parlow AF, Cheeseboro L, Ding YY, Russell RG, Lindemann D, Hartley A, Baker GR, Obici S, Deshaies Y, Ludgate M, Rossetti L, Scherer, PE. A transgenic mouse with a deletion in the collagenous domain of adiponectin displays elevated circulating adiponectin and improved insulin sensitivity. Endocrinology 2004;145:367–83.

- 61. Bersinger NA, Wunder DM. Adiponectin isoform distribution in serum and in follicular fluid of women undergoing treatment by ICSI. Acta Obstet Gynecol Scand 2010;89:782–8.
- Bersinger NA, Birkhäuser MH, Wunder DM. Adiponectin as a marker of success in intracytoplasmic sperm injection/embryo transfer cycles. Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol 2006;22:479–83.
- 63. Caminos JE, Nogueiras R, Gallego R, Bravo S, Tovar S, García-Caballero T, Casanueva FF, Diéguez C. Expression and regulation of adiponectin and receptor in human and rat placenta. J Clin Endocrinol Metab 2005;90:4276–86.
- 64. Benaitreau D, Dos Santos E, Leneveu M-C, De Mazancourt P, Pecquery R, Dieudonné M-N. Adiponectin promotes syncytialisation of BeWo cell line and primary trophoblast cells. Reprod Biol Endocrinol RBE 2010;8:128.
- 65. Corbetta S, Bulfamante G, Cortelazzi D, Barresi V, Cetin I, Mantovani G, Bondioni S, Beck-Peccoz P, Spada A. Adiponectin expression in human fetal tissues during mid- and late gestation. J Clin Endocrinol Metab 2005;90:2397–402.
- 66. Basu S, Laffineuse L, Presley L, Minium J, Catalano PM, Hauguel-de Mouzon S. In utero gender dimorphism of adiponectin reflects insulin sensitivity and adiposity of the fetus. Obes Silver Spring Md 2009;17:1144–9.
- Drolet R, Bélanger C, Fortier M, Huot C, Mailloux J, Légaré D, Tchernof A. Fat depot-specific impact of visceral obesity on adipocyte adiponectin release in women. Obes Silver Spring Md 2009;17:424–30.
- 68. Benaitreau D, Dieudonné M-N, Dos Santos E, Leneveu M-C, Mazancourt P de, Pecquery R. Antiproliferative effects of adiponectin on human trophoblastic cell lines JEG-3 and BeWo. Biol Reprod 2009;80:1107–14.
- Benaitreau D, Dos Santos E, Leneveu M-C, Alfaidy N, Feige J-J, de Mazancourt P, Pecquery R, Dieudonné MN. Effects of adiponectin on human trophoblast invasion. J Endocrinol 2010;207:45–53.
- McDonald EA, Wolfe MW. Adiponectin attenuation of endocrine function within human term trophoblast cells. Endocrinology 2009;150:4358–65.
- Maruo T, Matsuo H, Murata K, Mochizuki M. Gestational agedependent dual action of epidermal growth factor on human placenta early in gestation. J Clin Endocrinol Metab 1992;75:1362–7.
- Jones HN, Jansson T, Powell TL. Full-length adiponectin attenuates insulin signaling and inhibits insulin-stimulated amino Acid transport in human primary trophoblast cells. Diabetes 2010;59:1161–70.
- 73. Aye IL, Powell TL, Jansson T. Review: Adiponectin-the missing link between maternal adiposity, placental transport and fetal growth? Placenta 2013;34(Suppl):S40–5.
- 74. Wang C, Xin X, Xiang R, Ramos FJ, Liu M, Lee HJ, Chen H, Mao X, Kikani CK, Liu F, Dong LQ. Yin-Yang regulation of adiponectin signaling by APPL isoforms in muscle cells. J Biol Chem 2009;284:31608–15.
- McDonald EA, Wolfe MW. The pro-inflammatory role of adiponectin at the maternal-fetal interface. Am J Reprod Immunol 2011;66:128–36.
- Chen G-Y, Tang J, Zheng P, Liu Y. CD24 and Siglec-10 selectively repress tissue damage-induced immune responses. Science 2009;323:1722–5.
- 77. Ouchi N, Kobayashi H, Kihara S, Kumada M, Sato K, Inoue T, Funahashi T, Walsh K. Adiponectin stimulates angiogenesis by

promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in endothelial cells. J Biol Chem 2004;279:1304–9.

- 78. Bråkenhielm E, Veitonmäki N, Cao R, Kihara S, Matsuzawa Y, Zhivotovsky B, Funahashi T, Cao Y. Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA 2004;101:2476–81.
- 79. Lappas M, Permezel M, Rice GE. Leptin and adiponectin stimulate the release of proinflammatory cytokines and prostaglandins from human placenta and maternal adipose tissue via nuclear factor-kappaB, peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma and extracellularly regulated kinase 1/2. Endocrinology 2005;146:3334–42.
- 80. Rice GE. Cytokines and the initiation of parturition. Front Horm Res 2001;27:113-46.
- Psychoyos A. Hormonal control of ovoimplantation. Vitam Horm 1973;31:201–56.
- Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. Hum Reprod Update 2006;12:731–46.
- Cavagna M, Mantese JC. Biomarkers of endometrial receptivity– a review. Placenta 2003;24(Suppl B):S39–47.
- 84. Gellersen B, Brosens J. Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair. J Endocrinol 2003;178:357–72.
- Dessolle L, Daraï E, Cornet D, Rouzier R, Coutant C, Mandelbaum J, Antoine JM. Determinants of pregnancy rate in the donor oocyte model: a multivariate analysis of 450 frozen-thawed embryo transfers. Hum Reprod Oxf Engl 2009;24:3082–9.
- 86. Bellver J, Martínez-Conejero JA, Labarta E, Alamá P, Melo MA, Remohí J, Pellicer A, Horcajadas JA. Endometrial gene expression in the window of implantation is altered in obese women especially in association with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 2011;95:2335–41, 2341.e1–8.
- Timeva T, Shterev A, Kyurkchiev S. Recurrent implantation failure: the role of the endometrium. J Reprod Infertil 2014;15:173–83.
- Dekel N, Gnainsky Y, Granot I, Mor G. Inflammation and implantation. Am J Reprod Immunol 2010;63:17–21.
- Den Brok MH, Nierkens S, Figdor CG, Ruers TJ, Adema GJ. Dendritic cells: tools and targets for antitumor vaccination. Expert Rev Vaccines 2005;4:699–710.
- 90. Gonzalez RR, Leavis P. Leptin upregulates beta3-integrin expression and interleukin-1beta, upregulates leptin and leptin receptor expression in human endometrial epithelial cell cultures. Endocrine 2001;16:21–8.
- 91. Ramos MP, Rueda BR, Leavis PC, Gonzalez RR. Leptin serves as an upstream activator of an obligatory signaling cascade in the embryo-implantation process. Endocrinology 2005;146:694–701.
- 92. Gonzalez RR, Rueda BR, Ramos MP, Littell RD, Glasser S, Leavis PC. Leptin-induced increase in leukemia inhibitory factor and its receptor by human endometrium is partially mediated by interleukin 1 receptor signaling. Endocrinology 2004;145:3850–7.
- 93. Carino C, Olawaiye AB, Cherfils S, Serikawa T, Lynch MP, Rueda BR, Gonzalez RR. Leptin regulation of proangiogenic molecules in benign and cancerous endometrial cells. Int J Cancer J Int Cancer 2008;123:2782–90.
- 94. Lin X-H, Liu M-E, Xu H-Y, Chen X-J, Wang H, Tian S, Sheng JZ, Huang HF. Leptin down-regulates γ-ENaC expression: a novel mechanism involved in low endometrial receptivity. Fertil Steril 2015;103:228–35.e3.

- 95. Zhang RJ, Zou LB, Zhang D, Tan YJ, Wang TT, Liu AX, Qu F, Meng Y, Ding GL, Lu YC, Lv PP, Sheng JZ, Huang HF. Functional expression of large-conductance calcium-activated potassium channels in human endometrium: a novel mechanism involved in endometrial receptivity and embryo implantation. J Clin Endocrinol Metab 2012;97:543–53.
- 96. Tennekoon KH, Eswaramohan T, Karunanayake EH. Effect of leptin on prolactin and insulin-like growth factor-I secretion by cultured rat endometrial stromal cells. Fertil Steril 2007;88:193–9.
- 97. Tanaka T, Utsunomiya T, Bai T, Nakajima S, Umesaki N. Leptin inhibits decidualization and enhances cell viability of normal human endometrial stromal cells. Int J Mol Med 2003;12:95–8.
- 98. Alfer J, Müller-Schöttle F, Classen-Linke I, von Rango U, Happel L, Beier-Hellwig K, Rath W, Beier HM. The endometrium as a novel target for leptin: differences in fertility and subfertility. Mol Hum Reprod 2000;6:595–601.
- 99. Wang Y, Qiao J, Liu L, Chen Y, Li M. [Expression of leptin and long form of leptin receptors messenger ribonucleic acid and protein in endometrium of patients with polycystic ovary syndrome]. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi 2003;38:398–401.
- 100. Kao LC, Germeyer A, Tulac S, Lobo S, Yang JP, Taylor RN, Osteen K, Lessey BA, Giudice LC. Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate genes for disease-based implantation failure and infertility. Endocrinology 2003;144:2870–81.
- 101. Dos Santos E, Serazin V, Morvan C, Torre A, Wainer R, de Mazancourt P, Dieudonné MN. Adiponectin and leptin systems in human endometrium during window of implantation. Fertil Steril 2012;97:771–8.e1.
- 102. Takemura Y, Osuga Y, Yamauchi T, Kobayashi M, Harada M, Hirata T, Morimoto C, Hirota Y, Yoshino O, Koga K, Yano T, Kadowaki T, Taketani Y. Expression of adiponectin receptors and its possible implication in the human endometrium. Endocrinology 2006;147:3203–10.
- 103. Bohlouli S, Khazaei M, Teshfam M, Hassanpour H. Adiponectin effect on the viability of human endometrial stromal cells and mRNA expression of adiponectin receptors. Int J Fertil Steril 2013;7:43–8.
- 104. Cong L, Gasser J, Zhao J, Yang B, Li F, Zhao AZ. Human adiponectin inhibits cell growth and induces apoptosis in human endometrial carcinoma cells, HEC-1-A and RL95 2. Endocr Relat Cancer 2007;14:713–20.
- 105. Henson MC, Swan KF, O'Neil JS. Expression of placental leptin and leptin receptor transcripts in early pregnancy and at term. Obstet Gynecol 1998;92:1020–8.
- 106. Highman TJ, Friedman JE, Huston LP, Wong WW, Catalano PM. Longitudinal changes in maternal serum leptin concentrations, body composition, and resting metabolic rate in pregnancy. Am J Obstet Gynecol 1998;178:1010–5.
- 107. Catalano PM, Nizielski SE, Shao J, Preston L, Qiao L, Friedman JE. Downregulated IRS-1 and PPARgamma in obese women with gestational diabetes: relationship to FFA during pregnancy. Am J Physiol Endocrinol Metab 2002;282:E522–33.
- 108. Elshoreya H, Steinberg F, Perry R, Hansen C, Milcareck B, Elkouachi S, Check JH. Serum adiponectin levels are significantly reduced during the second half of normal pregnancy. Clin Exp Obstet Gynecol 2011;38:211–3.
- 109. Beischer NA, Wein P, Sheedy MT, Dargaville RM. Effect of follow-up of women with gestational diabetes on the ratio

of IDDM to NIDDM in pregnancy. Diabetes Care 1996;19: 653-5.

- 110. Bao W, Baecker A, Song Y, Kiely M, Liu S, Zhang C. Adipokine levels during the first or early second trimester of pregnancy and subsequent risk of gestational diabetes mellitus: A systematic review. Metabolism 2015;64:756–64.
- 111. Lain KY, Daftary AR, Ness RB, Roberts JM. First trimester adipocytokine concentrations and risk of developing gestational diabetes later in pregnancy. Clin Endocrinol (Oxf) 2008;69:407–11.
- 112. Kautzky-Willer A, Pacini G, Tura A, Bieglmayer C, Schneider B, Ludvik B, Prager R, Waldhäusl W. Increased plasma leptin in gestational diabetes. Diabetologia 2001;44:164–72.
- 113. Qiu C, Williams MA, Vadachkoria S, Frederick IO, Luthy DA. Increased maternal plasma leptin in early pregnancy and risk of gestational diabetes mellitus. Obstet Gynecol 2004;103:519–25.
- 114. Vázquez MJ, Romero-Ruiz A, Tena-Sempere M. Roles of leptin in reproduction, pregnancy and polycystic ovary syndrome: consensus knowledge and recent developments. Metabolism 2015;64:79–91.
- 115. Cortelazzi D, Corbetta S, Ronzoni S, Pelle F, Marconi A, Cozzi V, Cetin I, Cortelazzi R, Beck-Peccoz P, Spada A. Maternal and foetal resistin and adiponectin concentrations in normal and complicated pregnancies. Clin Endocrinol (Oxf) 2007;66:447–53.
- 116. Gross GA, Solenberger T, Philpott T, Holcomb WL, Landt M. Plasma leptin concentrations in newborns of diabetic and nondiabetic mothers. Am J Perinatol 1998;15:243–7.
- 117. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. Lancet Lond Engl 2005;365:785–99.
- 118. Sankaralingam S, Arenas IA, Lalu MM, Davidge ST. Preeclampsia: current understanding of the molecular basis of vascular dysfunction. Expert Rev Mol Med 2006;8:1–20.
- Hogg K, Blair JD, von Dadelszen P, Robinson WP. Hypomethylation of the LEP gene in placenta and elevated maternal leptin concentration in early onset pre-eclampsia. Mol Cell Endocrinol 2013;367:64–73.
- 120. Rigó J, Szendei G, Rosta K, Fekete A, Bögi K, Molvarec A, Rónai Z, Vér A. Leptin receptor gene polymorphisms in severely pre-eclamptic women. Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol 2006;22:521–5.
- 121. Ouyang Y, Chen H, Chen H. Reduced plasma adiponectin and elevated leptin in pre-eclampsia. Int J Gynaecol Obstet Off Organ Int Fed Gynaecol Obstet 2007;98:110–4.
- 122. Suwaki N, Masuyama H, Nakatsukasa H, Masumoto A, Sumida Y, Takamoto N, Hiramatrsu Y. Hypoadiponectinemia and circulating angiogenic factors in overweight patients complicated with pre-eclampsia. Am J Obstet Gynecol 2006;195:1687–92.
- 123. Thyfault JP, Hedberg EM, Anchan RM, Thorne OP, Isler CM, Newton ER, Dohm GL, deVente JE. Gestational diabetes is associated with depressed adiponectin levels. J Soc Gynecol Investig 2005;12:41–5.
- 124. O'Sullivan AJ, Kriketos AD, Martin A, Brown MA. Serum adiponectin levels in normal and hypertensive pregnancy. Hypertens Pregnancy 2006;25:193–203.
- 125. Dalamaga M, Srinivas SK, Elovitz MA, Chamberland J, Mantzoros CS. Serum adiponectin and leptin in relation to risk for preeclampsia: results from a large case-control study. Metabolism 2011;60:1539–44.

- 126. Kajantie E, Kaaja R, Ylikorkala O, Andersson S, Laivuori H. Adiponectin concentrations in maternal serum: elevated in preeclampsia but unrelated to insulin sensitivity. J Soc Gynecol Investig 2005;12:433–9.
- 127. Saarela T, Hiltunen M, Helisalmi S, Heinonen S, Laakso M. Adiponectin gene haplotype is associated with preeclampsia. Genet Test 2006;10:35–9.
- 128. Franks S. Polycystic ovary syndrome. N Engl J Med 1995;333: 853-61.
- 129. Toulis KA, Goulis DG, Farmakiotis D, Georgopoulos NA, Katsikis I, Tarlatzis BC, Papadimas I, Panidis D. Adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and a meta-analysis. Hum Reprod Update 2009;15:297–307.
- 130. Chou SH, Mantzoros C. 20 years of leptin: role of leptin in human reproductive disorders. J Endocrinol 2014;223:T49–62.
- 131. Heinonen S, Korhonen S, Helisalmi S, Koivunen R, Tapanainen J, Hippeläinen M, Laakso M. Associations between two single nucleotide polymorphisms in the adiponectin gene and polycystic ovary syndrome. Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol 2005;21:165–9.
- 132. Briana DD, Malamitsi-Puchner A. Intrauterine growth restriction and adult disease: the role of adipocytokines. Eur J Endocrinol Eur Fed Endocr Soc 2009;160:337–47.
- 133. Ibáñez L, Sebastiani G, Lopez-Bermejo A, Díaz M, Gómez-Roig MD, de Zegher F. Gender specificity of body adiposity and circulating adiponectin, visfatin, insulin, and insulin growth factor-I at term birth: relation to prenatal growth. J Clin Endocrinol Metab 2008;93:2774–8.
- 134. Kamoda T, Saitoh H, Saito M, Sugiura M, Matsui A. Serum adiponectin concentrations in newborn infants in early postnatal life. Pediatr Res 2004;56:690–3.
- 135. Evagelidou EN, Giapros VI, Challa AS, Kiortsis DN, Tsatsoulis AA, Andronikou SK. Serum adiponectin levels, insulin resistance, and lipid profile in children born small for gestational age are affected by the severity of growth retardation at birth. Eur J Endocrinol Eur Fed Endocr Soc 2007;156:271–7.
- Karowicz-Bilińska A. [Leptin concentration in women with normal pregnancy and intrauterine growth retardation]. Ginekol Pol 2004;75:10-4.
- 137. Pighetti M, Tommaselli GA, D'Elia A, Di Carlo C, Mariano A, Di Carlo A, Nappi C. Maternal serum and umbilical cord blood leptin concentrations with fetal growth restriction. Obstet Gynecol 2003;102:535–43.
- 138. Arslan M, Yazici G, Erdem A, Erdem M, Arslan EO, Himmetoglu O. Endothelin 1 and leptin in the pathophysiology of intrauterine growth restriction. Int J Gynaecol Obstet Off Organ Int Fed Gynaecol Obstet 2004;84:120–6.
- 139. Sooranna SR, Ward S, Bajoria R. Fetal leptin influences birth weight in twins with discordant growth. Pediatr Res 2001;49:667–72.
- 140. Nácul AP, Lecke SB, Edelweiss MI, Morsch DM, Spritzer PM. Gene expression of leptin and long leptin receptor isoform in endometriosis: a case-control study. Obstet Gynecol Int 2013;2013:879618.
- 141. Takemura Y, Osuga Y, Harada M, Hirata T, Koga K, Morimoto C, Hirota Y, Yoshino O, Yano T, Taketani Y. Serum adiponectin

concentrations are decreased in women with endometriosis. Hum Reprod Oxf Engl 2005;20:3510–3.

- 142. Lage M, Garcia-Mayor RV, Tomé MA, Cordido F, Valle-Inclan F, Considine RV, Caro JF, Dieguez C, Casanueva, FF. Serum leptin levels in women throughout pregnancy and the postpartum period and in women suffering spontaneous abortion. Clin Endocrinol (Oxf) 1999;50:211–6.
- 143. Laird SM, Quinton ND, Anstie B, Li TC, Blakemore AI. Leptin and leptin-binding activity in women with recurrent miscarriage: correlation with pregnancy outcome. Hum Reprod Oxf Engl 2001;16:2008–13.
- 144. Tommaselli GA, Di Spiezio Sardo A, Di Carlo C, Bifulco G, Cerrota G, Cirillo D, Greco E, Nappi C. Do serum leptin levels have a role in the prediction of pregnancy outcome in case of threatened miscarriage? Clin Endocrinol (Oxf) 2006;65:772–5.
- 145. Demir B, Guven S, Guven ES, Atamer Y, Gunalp GS, Gul T. Serum leptin level in women with unexplained infertility. J Reprod Immunol 2007;75:145–9.
- 146. Saeed Z, Haleh S, Afsaneh M, Soheila A, Amir Hassan Z, Farah I, Banafsheh T, Elham SS, Narges MB, Mahmood JT. Serum leptin levels in women with immunological recurrent abortion. J Reprod Infertil 2010;11:47–52.
- 147. Verma PK, Prakash S, Parveen F, Faridi RM, Agrawal S. Genetic association of adipokine and UCP2 polymorphism with recurrent miscarriage among non-obese women. Reprod Biomed Online 2012;25:527–35.
- 148. Matteo M, Greco P, Levi Setti PE, Morenghi E, De Rosario F, Massenzio F, Albani E, Totaro P, Liso A. Preliminary evidence for high anti-PLAC1 antibody levels in infertile patients with repeated unexplained implantation failure. Placenta 2013;34:335–9.
- 149. Zaletel J, Barlovic DP, Prezelj J. Adiponectin-leptin ratio: a useful estimate of insulin resistance in patients with Type 2 diabetes. J Endocrinol Invest 2010;33:514–8.
- 150. Kotani K, Sakane N. Leptin:adiponectin ratio and metabolic syndrome in the general Japanese population. Korean J Lab Med 2011;31:162–6.
- 151. Grossmann ME, Ray A, Nkhata KJ, Malakhov DA, Rogozina OP, Dogan S, Cleary MP. Obesity and breast cancer: status of leptin and adiponectin in pathological processes. Cancer Metastasis Rev 2010;29:641–53.
- 152. Mistry T, Digby JE, Desai KM, Randeva HS. Leptin and adiponectin interact in the regulation of prostate cancer cell growth via modulation of p53 and bcl-2 expression. BJU Int 2008;101:1317–22.
- 153. Ashizawa N, Yahata T, Quan J, Adachi S, Yoshihara K, Tanaka K. Serum leptin-adiponectin ratio and endometrial cancer risk in postmenopausal female subjects. Gynecol Oncol 2010;119: 65–9.
- 154. Chen DC, Chung YF, Yeh YT, Chaung HC, Kuo FC, Fu OY, Chen HY, Hou MF, Yuan SS. Serum adiponectin and leptin levels in Taiwanese breast cancer patients. Cancer Lett 2006;237:109–14.
- 155. Li L, Ferin M, Sauer MV, Lobo RA. Ovarian adipocytokines are associated with early in vitro human embryo development independent of the action of ovarian insulin. J Assist Reprod Genet 2012;29:1397–404.

# COMMUNICATIONS ORALES ET POSTERS

### Communications orales

**SEPTEMBRE 2017** Sixième rencontre du Groupe de la Francophonie Placentaire Rôles de l'adiponectine sur le métabolisme et le trafic du glycogène endométrial vers le placenta humain. Domaine de la Merci, Grenoble, France.

MAI 2017 | Journée des doctorants en Biologie du Développement et Reproduction
Rôles de l'adiponectine à l'interface fœto-maternelle humaine au cours du premier trimestre de grossesse. Domaine de Vilvert, Jouy-en-Josas, France.

**AVRIL 2017** | Deuxièmes journées Reprosciences du GDR 3606 REPRO

Adiponectin limits trophoblast invasion in human decidualized endometrial stromal cells. Parc de Grandmont, Tours, France.

**SEPTEMBRE 2016** 21<sup>èmes</sup> journées de la Fédération Française d'Etude de la Reproduction **Effets de l'adiponectine sur les cellules endométriales stromales humaines.** Maison de la Chimie, Paris, France.

**MAI 2016** Journée des doctorants en Biologie du Développement et Reproduction **Rôles de l'adiponectine à l'interface fœto-maternelle en conditions normales et pathologiques.** Domaine de Vilvert, Jouy-en-Josas, France.

JUIN 2015 | Quatrième rencontre du Groupe de la Francophonie Placentaire

Rôles de l'adiponectine dans le placenta humain : implications sur le contrôle de la croissance fœtale. Auditoire de la Maternité, Genève, Suisse.

**AVRIL 2015** | Premières journées Reprosciences du GDR 3606 REPRO

Adiponectin effects in human trophoblastic cells and its possible implication on fetal growth. Campus de Beaulieu, Rennes, France.

# Posters

**SEPTEMBRE 2017** International Federation of Placenta Associations meeting

Adiponectin regulates glycogen metabolism and trafficking towards placenta at the human fetal-maternal interface. Manchester Central, Manchester, Royaume-Uni.

**AVRIL 2017** | Deuxièmes journées Reprosciences du GDR 3606 REPRO

Adiponectin limits decidualization and trophoblast invasion in human endometrial stromal cells. Parc de Grandmont, Tours, France.

**SEPTEMBRE 2016** 21<sup>èmes</sup> journées de la Fédération Française d'Etude de la Reproduction Adiponectin limits trophoblast invasion in decidualized human stromal cells. Maison de la Chimie, Paris, France.

**AVRIL 2015** | Premières journées Reprosciences du GDR 3606 REPRO

Adiponectin regulates nutrient transport and apoptosis in first-trimester human villous trophoblast cells. Campus de Beaulieu, Rennes, France.

# Rôles de l'adiponectine à l'interface fœto-maternelle humaine au cours du premier trimestre de grossesse

Mots clés : Adiponectine, Endomètre humain, Placenta humain, Décidualisation, Implantation Embryonnaire, Croissance fœtale

#### Résumé :

L'implantation embryonnaire repose sur une synchronisation spatio-temporelle entre un placenta fonctionnel et un endomètre réceptif. La réceptivité endométriale requiert la différenciation des cellules stromales en cellules déciduales sous l'effet des hormones ovariennes (œstrogènes et progestérone). Le placenta est un organe transitoire constitué de deux types cellulaires. Le cytotrophoblaste villeux est responsable des échanges fœtomaternels et de la fonction endocrine du placenta. Le cytotrophoblaste extravilleux présente des propriétés invasives et assure ainsi l'ancrage du placenta dans l'endomètre maternel. Un dialogue paracrine complexe entre les cellules placentaires et endométriales s'établit au cours des premières étapes de l'implantation.

L'adiponectine est une adipokine produite majoritairement par le tissu adipeux. Elle contrôle le métabolisme glucidolipidique et joue le rôle d'hormone insulino-sensibilisatrice. Dans de nombreux tissus, l'adiponectine exerce des effets anti-prolifératifs, pro-invasifs et pro-différenciants. L'adiponectine et ses récepteurs ADIPOR1 et ADIPOR2 sont présents à l'interface fœto-maternelle. Le placenta et l'endomètre sont donc des tissus cibles de l'adiponectine. Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés aux effets directs de l'adiponectine à l'interface foetomaternelle au cours du premier trimestre de grossesse.

Dans une première partie, nous avons observé que l'adiponectine exerce des effets anti-différenciants et antiinvasifs dans les cellules stromales endométriales.

Dans un second temps, nous avons démontré que l'adiponectine favorise la production de glycogène dans les cellules déciduales. Inversement, l'adiponectine semble limiter l'entrée du glycogène dans les cellules placentaires. Ces résultats démontrent que l'adiponectine pourrait contrôler la nutrition histiotrophe du foetus.

Dans une dernière partie, nous avons observé que l'adiponectine diminue l'expression des transporteurs de nutriments et exerce une action pro-apoptotique dans le trophoblaste villeux. Ces derniers résultats pourraient permettre de mieux comprendre le rôle de l'adiponectine dans les pathologies placentaires telles que le retard de croissance intra-utérin qui se caractérise par une diminution du poids foetal et une augmentation de l'apoptose des cellules trophoblastiques.

L'ensemble de ces résultats montre que l'adiponectine est un acteur clé du dialogue foeto-maternel au cours de la grossesse précoce en contrôlant la maturation d'un endomètre fonctionnel et en régulant les échanges nutritifs transplacentaires.

#### Adiponectin roles at the human fetal-maternal interface in first-trimester of pregnancy

Mots clés : Adiponectin, Human endometrium, Human placenta, Decidualization, Embryo implantation, Fetal growth

#### Abstract:

Embryo implantation requires a spatiotemporal synchronization between a functional placenta and a receptive endometrium. Endometrium receptivity based on the differentiation of stromal cells into decidual cells, under the influence of ovarian hormones (estrogens and progesterone). The placenta is a transient organ composed of two cell types. Villous trophoblast ensures fetalmaternal exchanges and the endocrine functions. Extravillous trophoblast acquire an invasive phenotype resulting in the placenta anchoring in the endometrium. Then, a complexe paracrine dialog between placental cells and endometrial cells is established during the first stages of the embryo implantation.

Adiponectin is an adipokine predominantly produced by the adipose tissue. This cytokine has an important role in the control of energy metabolism and displays an insulinsensitizing action. In some cell types, adiponectin limits proliferation, but promotes invasion and differentiation. Adiponectin and its receptors ADIPOR1 and ADIPOR2, are expressed at the fetal-maternal interface. Thus, endometrium and placenta are adiponectin targets. In this work, we aimed to determine adiponectin direct effects at the human fetal maternal interface during the first trimester of pregnancy.

In a first part, we observed that adiponectin limits differentiation and invasion in endometrial stromal cells.

In a second part, we showed that adiponectin promotes glycogen production by decidual cells. Conversely, adiponectin seems to limit glycogen uptake by placental cells. These results demonstrate that adiponectin could regulate histiotrophic nutrition to the fetus.

In a last part, we demonstrated that adiponectin downregulates the expression of nutrient transporters and promotes apoptosis in villous trophoblast. These last results could help to better understand the adiponectin roles in some placental pathologies, as intrauterine growth restriction, characterized by a decreased fetal weight and a enhanced trophoblastic apoptosis.

Altogether, these results demonstrate that adiponectin is a key regulator of the fetal-maternal dialog by controlling the differentiation of a functional endometrium and by regulating transplacental nutrient exchanges.