



HAL
open science

Impact de l'obésité maternelle sur les fonctions placentaires : rôles de la leptine et de l'adiponectine

Perrine Nogues

► **To cite this version:**

Perrine Nogues. Impact de l'obésité maternelle sur les fonctions placentaires : rôles de la leptine et de l'adiponectine. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Saclay (COMUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLV101 . tel-02614262

HAL Id: tel-02614262

<https://theses.hal.science/tel-02614262>

Submitted on 20 May 2020

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.

Impact de l'obésité maternelle sur les fonctions placentaires : rôles de la leptine et de l'adiponectine

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)
Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé

Thèse présentée et soutenue à l'UFR Simone Veil-Santé, Montigny-le-Bretonneux,
le 19 décembre 2019, par

Madame Perrine NOGUES

Composition du Jury :

Mme Nadia ALFAIDY Directrice de recherches – INSERM U1036 - CEA, Grenoble	Rapporteur
Mme Joëlle DUPONT Directrice de recherches – UMR-85 - INRA, Tours	Rapporteur
Mr Jacky NIZARD Professeur des Universités – AP-HP, Paris	Examineur
Mme Patricia PARNET Directrice de recherches – UMR_A 1280 – INRA, Nantes	Examineur
Mme Marie-Noëlle DIEUDONNE Professeur des Universités – EA-7404 – Université Paris-Saclay	Directeur de thèse
Mme Delphine MITANCHEZ Professeur des Universités – Université de Tours, Tours	Invité
Mme Patricia PARNET Directrice de recherches – UMR_A 1280 – INRA, Nantes	Président du jury

REMERCIEMENTS

J'adresse mes remerciements tout d'abord à l'ensemble des membres du jury qui ont évalué ce travail de thèse. Merci au Dr. Joëlle Dupont et au Pr. Nadia Alfaïdy pour avoir accepté le rôle de rapporteurs. Je vous remercie du temps que vous avez accordé à ce manuscrit et pour vos remarques constructives pour l'améliorer. Merci au Pr. Patricia Parnet et au Dr. Jacky Nizard d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie également les membres de mon comité de thèse, le Pr. Sophie Gil et le Dr. Delphine Mitanchez pour avoir suivi ce travail de thèse durant ces trois années et pour leurs remarques pertinentes.

Je souhaite remercier le Pr. François Vialard pour son accueil au sein de l'équipe Gamètes-Implantation-Gestation. Merci de m'avoir permis de vivre cette expérience enrichissante et merci pour tes conseils et ton humour inimitable.

Je souhaite exprimer tout particulièrement ma gratitude à ma directrice de thèse, le Pr. Marie-Noëlle Dieudonné pour m'avoir donné l'opportunité de mener à bien ce projet de thèse passionnant. Merci pour ta gentillesse, ta présence quotidienne et tes précieux conseils pour toujours aller plus loin, plus haut. Je te remercie pour le guide que tu as été, pour tout le savoir que tu m'as transmis et pour la liberté que tu m'as laissée à la fois pour la conduite du projet de thèse, mais également pour développer mes compétences transversales par les formations.

Je suis grandement reconnaissante au Dr. Esther Dos Santos. Merci pour toute l'implication dont tu as fait preuve durant ce projet de thèse, pour ton aide au laboratoire comme pour la rédaction d'articles. Je te remercie pour tout le savoir que tu m'as transmis, pour tes encouragements et pour ta douceur.

Je tiens à exprimer mes remerciements à l'ensemble des membres de l'équipe GIG, pour votre accueil et vos conseils précieux. Je souhaite remercier plus particulièrement le Dr. Paul Berveiller, sans qui notre projet de recherche n'aurait pu se développer à l'hôpital de Poissy-St-Germain-en-Laye. Merci pour toute ton aide, tes conseils et pour nous avoir fourni notre

matériel de travail. J'exprime également ma gratitude au Dr. Valérie Sérazin pour toute son aide et ses précieux conseils en qPCR. 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. L'ensemble des étudiants sont chouchoutés avec vous.

Merci à Benoit Maury pour la touche sudiste du laboratoire. Merci pour ta bonne humeur, tes encouragements, tes conseils et les « barres de rire » à la pause déjeuner. En « option », merci pour le savoir que tu m'as transmis en imagerie.

Je souhaite également exprimer mes remerciements à toutes les équipes avec qui j'ai collaboré. Merci aux sages-femmes et aux infirmières de la maternité de l'hôpital de Poissy-St-Germain-en-Laye pour m'avoir aidé à obtenir les placentas. Merci pour leur volonté de faire avancer un projet de recherche en plus de leurs responsabilités hospitalières. Merci au service d'anatomie pathologique de l'hôpital de Poissy-St-Germain-en-Laye pour avoir contribué à ce projet de recherche.

Je souhaite remercier l'unité BDR de l'INRA de Jouy-en-Josas. Un immense merci au Pr. Hélène Jammes pour avoir grandement contribué à ce travail de thèse. Merci d'avoir enrichi mes connaissances et surtout merci pour ta douceur et de m'avoir encouragé à toujours croire en mon travail. Merci à l'ER5 pour son accueil et son soutien, Charline, Aurélie, Mélanie, Audrey, Eli, Hélène.K, Anne. Merci également au Dr. Anne Tarrade pour ta participation à ce projet de thèse et tes précieuses remarques. Je remercie le Dr. Delphine Rousseau pour ses conseils et le temps que accordé à m'expliquer comment ce « maudit » logiciel R fonctionne. Bien sûr, je tiens à remercier les petites mains et le grand cœur de Lucie Arnould, qui a contribué pleinement à ce projet de thèse. Merci pour ton implication si rigoureuse, pour tes bonnes idées et pour avoir été une oreille attentive. J'ai été ravie de travailler avec toi et je te souhaite tout le bonheur que tu mérites pour la suite. Je tiens à remercier Fabien Duval qui a été présent et m'a beaucoup aidé dans les débuts de ma thèse. Merci pour ton sourire et pour ta si belle écriture. Personne ne reproduira jamais des cahiers de laboratoire si parfaits. Ton travail rigoureux, tes capacités de raisonnement et d'écriture ont été un modèle pour moi.

Je souhaite également dire un grand merci à mes petites étudiantes de M1, Cécile et Lucile.

Travailler avec vous était un plaisir. Je vous souhaite à toutes les deux de trouver votre voie et de vous épanouir.

Le meilleur reste à venir et pas des moindres. Cette dernière année de thèse a été de loin la plus difficile, mais aussi la meilleure qui soit. J'ai eu l'occasion de créer des liens avec des personnes exceptionnelles, mes petits « padawans », qui ont contribué à éclairer mes journées. Farah, Anissa, Camille et Marta, sans vous, cette dernière année n'aurait pas eu le même goût. Vous m'avez apporté beaucoup de fraîcheur dans mon « vieil âge ». Merci à toi Farah avec ton innocence, vous me faites tellement rire. « ah mes oreilles Perrine ». Mais ce qui me touche c'est ta gentillesse et ta douceur, si précieuses. Anissa ou « spontanéité » est ton 2^e prénom. Avec toi, c'est du « tac au tac » et rire à volonté. Je salue ton énergie, ta volonté et ton côté très proactif. Camille, je n'ai pas les mêmes talents que toi pour la poésie. Toi et tes blagues, tes jeux de mots et ta tête de coupable, c'est fou rire garanti. On se demande toujours ce qu'il se passe dans ta tête, mieux vaut ne pas le savoir. Mais ce qui est sûr, c'est qu'elle est riche et brillante cette tête. Marta, notre plus jeune padawan, tu n'as pas apporté le soleil de l'Espagne dans notre ciel nuageux Français mais tu as illuminé notre intérieur. Tu étais la pièce manquante à notre petit groupe, celle qui apporte la touche de chaleur et le bronzage d'été à longueur d'année. Ne perds jamais ta gentillesse, ta persévérance et n'oublie pas de croire en ton travail. rrrrKakat' un jour, rrrrKatat' toujours ! Je vous souhaite tout le bonheur et la réussite que vous méritez.

Je finirai ces remerciements par les personnes qui comptent le plus dans ma vie. Je tiens à remercier chaleureusement tous mes amis. Kévinou, je ne te remercierai jamais assez pour toujours voir le bien, le bon côté des choses, du positif partout. J'aimerais parfois pouvoir penser comme toi. Merci à Messan, pour être un ami précieux et un confident. Je ne me lasse pas de nos sessions salsa. Je tiens aussi à remercier chaleureusement mon « binôme », Issa, qui est entré dans ma vie récemment mais qui a immédiatement su occuper une place précieuse. Merci à mes supers « coupines » de Master Charlene, Morgane et Maud pour écouter mes plaintes, mes histoires, mes potins et me soutenir. J'espère avoir été présente pour vous comme vous l'avez été pour moi. Je remercie chaleureusement mon amie Louise. Depuis la

licence nous sommes restée proche et cette amitié me tiens très à cœur. Merci à mes « coupines » de BTS, Marie, Laetitia et Morgane, avec qui on entretient un « rendez-vous » annuel chaque été pour se raconter tous les potins des derniers mois, voire de l'année.

Je ne remercierai jamais assez deux amies qui me sont infiniment chères. Héloïse, depuis le bac, nous entretenons une amitié sans tabous et tu as toujours su trouver les mots dans les bons comme dans les mauvais moments. J'ai trouvé ma voie, je te souhaite de trouver la tienne au Québec et d'être heureuse comme tu le mérites.

Amélie, tu es de loin l'amitié la plus longue et la plus belle que j'ai. Tu as toujours cru en moi, plus que moi-même. Tu es toujours présente pour moi, tu n'as jamais douté de ma réussite et tes encouragements n'ont pas de prix. C'est aussi grâce à toi que j'ai pu aller si loin.

Je remercie également quelqu'un qui saura se reconnaître. Quand je t'ai rencontré, je ne me suis jamais sentie aussi complète. Personne ne pourra mieux me comprendre que toi. Nous étions comme le Yin et le Yang, l'un ne prenant son sens qu'avec l'autre. J'espère avoir élevé ton âme comme tu as élevé la mienne. Nos chemins se sont séparés, mais je te souhaite tout le bonheur du monde, car tu le mérites.

Enfin, je remercie les personnes que j'aime d'un amour indescriptible et incommensurable, mes parents. Tous les enfants le disent, alors je ne dérogerai pas à la règle : vous êtes les meilleurs parents du monde. Vous m'avez comblée, je n'ai jamais manqué de rien et vous avez toujours su être justes. Merci de m'avoir donné les moyens, jamais je n'aurais pu arriver où j'en suis sans vous. On dit souvent que les parents peuvent tout sacrifier pour leurs enfants, mais je crois que la réciproque est encore plus vraie. Mon plus grand objectif a toujours été de vous rendre fier de moi, car je crois qu'il n'y a pas plus beau cadeau que de voir dans les yeux de ses parents, le bonheur que leur inspire la réussite de leurs enfants. Maman, papa, le mot est trop faible pour décrire à quel point je vous aime.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	1
LISTE DES FIGURES	6
LISTE DES TABLES	8
INTRODUCTION	9
Chapitre 1 : Tissu adipeux et obésité	10
I. Le tissu adipeux	10
A. Définition et composition du tissu adipeux	10
B. Les facteurs synthétisés par le tissu adipeux : généralités	11
C. Les adipokines	13
1. La leptine	13
a) Structure du gène et de la protéine	13
b) Rôles physiologiques de la leptine	15
c) Synthèse et régulation de l'expression de la leptine	19
d) Les récepteurs et les voies de signalisation de la leptine	21
2. L'adiponectine	31
a) Structure du gène et de la protéine	31
b) Synthèse et régulation de l'expression de l'adiponectine	33
c) Les récepteurs et voies de signalisation de l'adiponectine	36
d) Rôles physiologiques de l'adiponectine	43
3. Les autres adipokines	45
II. L'obésité : généralités	50
A. Définition de l'obésité	50
B. Epidémiologie	51
D. Les causes	52
E. Les complications	53
III. Obésité : statut inflammatoire	54
A. Généralités	54
B. Inflammation du tissu adipeux	55
1. Obésité et profil immunitaire du tissu adipeux	57
2. Obésité et profil cytokinique du tissu adipeux	61
Chapitre 2 : le placenta humain	71
I. Le développement placentaire	71
A. L'implantation et le développement précoce du placenta	71
1. Apposition et adhésion du blastocyste	72
2. L'invasion trophoblastique	73
3. Le stade lacunaire	74
4. Le stade vilieux	74
B. Les lignages trophoblastiques	76
1. Le cytotrophoblaste vilieux	76
a) La différenciation morphologique	76
b) La différenciation biochimique	77
c) Rôle de l'apoptose dans le renouvellement du ST	77
2. Le cytotrophoblaste extravilieux	78
C. Mise en place de la circulation placentaire	80
1. La circulation fœtale	80
2. La circulation maternelle	80
3. Le placenta à terme	81
II. Les fonctions placentaires	82
A. La fonction d'échange	82
1. Les différents types de transports	82

a)	La diffusion simple	84
b)	Le transport facilité	85
c)	Le transport actif	85
2.	Le transport du glucose	86
a)	Les GLUTs	86
b)	Régulation du transport du glucose	90
3.	Le transport des acides aminés	90
a)	Transport des acides aminés neutres	92
b)	Transport des acides aminés cationiques	94
c)	Transport des acides aminés anioniques	95
d)	Régulation du transport des acides aminés	96
4.	Le transport des lipides	98
a)	Hydrolyse des lipides	99
b)	Les FATPs	100
c)	La FAT/CD36	101
d)	La p-FABPpm	102
e)	Les FABPs	102
B.	La fonction endocrine	104
1.	Les hormones polypeptidiques	105
a)	L'hormone chorionique gonadotrope	105
b)	L'hormone lactogène placentaire (hPL)	108
c)	L'hormone de croissance placentaire (hPGH)	109
d)	Protéine A plasmatique associée à la grossesse (PAPP-A)	110
e)	La protéine placentaire 13 (PP13)	111
f)	Les inhibines et les activines	112
2.	Les hormones stéroïdes	113
a)	La progestérone (P4)	113
b)	Les œstrogènes	116
3.	Les adipokines	117
a)	La leptine	118
b)	L'adiponectine	121
C.	La fonction immunitaire du placenta	124
Chapitre 3 : Impact de l'obésité sur les fonctions de reproduction de la femme		128
I.	Généralités	128
II.	Axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (HPG)	129
III.	L'ovogenèse	131
IV.	L'implantation embryonnaire	133
V.	La grossesse	136
DEMARCHE EXPERIMENTALE		139
I.	Présentation du laboratoire	140
II.	Contexte de recherche	141
III.	Objectifs du travail de thèse	143
IV.	Approches méthodologiques	144
V.	Collaborations	146
RESULTATS		148
Article 1		149
Article 2		209
DISCUSSION ET PERSPECTIVES		231
REFERENCES		245
COMMUNICATIONS		277

LISTE DES ABREVIATIONS

3β-HSD	3 β -hydroxysteroid dehydrogenase
11β-HSD1	11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1
17β-HSD	17 β -hydroxysteroid dehydrogenase
ACC1/2	Acétyl-CoA carboxylase
ADIPOR	Adiponectin receptors
ADN	Acide désoxyribonucléique
AG	Acides gras
AgRP	Agouti-related peptide
ALK	Activin receptor-like kinase
AMP	Adénosine monophosphate
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AMPK	AMP-activated protein kinase
Ang	Angiopoïétine
APN	Adiponectine
APPL	Adaptator protein containing pleckstrin homology and phosphotyrosine domains and leucine zipper motif
AQP	Aquaporines
ARA	Acide arachidonique
ARC	Noyau arqué
ARN	Acide ribonucléique
ASCT2	Alanine serine cysteine transporter 2
ATP	Adénosine triphosphate
BAX	Bcl-2 associated protein X
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BM	Basal membrane
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
CaMKKβ	Calcium/calmodulin-dependant kinase kinase beta
CAP1	Adenylyl cyclase-associated protein 1
CART	Cocaine and amphetamine regulated transcript
CBP	CREB-binding protein
CCL3	C-C motif ligand 3
CCR	C-C chemokine receptor
CCRL2	C-chemokine receptor like 2
CE	Ester de cholestérol
CETP	cholesterol ester transfer protein
CHD	Cytokines receptor homology domain
ChREBP	Carbohydrate-responsive element-binding protein
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMKLR1	Chemokine-like receptor 1
COX-2	Cyclo-oxygenase-2
CPT-1	Carnitine palmitoyl transferase-1
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response element-binding protein

CRH	Corticotropin releasing hormone
CRTC2	cAMP regulated transcriptional co-activator 2
CT	Cytotrophoblaste
CTEV	Cytotrophoblaste extra-villeux
CTV	Cytotrophoblaste villeux
DC	Cellule dendritique
DG	Diabète gestationnel
DHA	Acide docosahexaénoïque
DHEAS	Dehydroepiandrosterone sulfate
DT1	Diabète de type 1
DT2	Diabète de type 2
E1	Oestrone
E2	Oestradiol
E3	Oestriol
E4	Oestétrol
EEC	Cellules endothéliales endométriales
ERE	Estrogen-response element
ERK	Estrogen-response element
ESC	Cellule stromale endométriale
FABP	Fatty acid binding protein
fAD	Full-length adiponectin
FAT/CD36	Fatty acid translocase
FATP	Fatty acid transporter protein
FIZZ	Found in inflammatory zone
Fn3	Domaines fibronectine de type III
FSH	Follicle-stimulating hormone
FT	Facteurs de transcription
gAD	Globular adiponectin
GCM-1	Glial cell missing factor-1
GLUT	Glucose transporter
GH	Growth hormone
GM-CSF	Facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages
GnRH	Gonadotropin-releasing hormone
GPCR	Récepteur couplé aux protéines G
Grb-2	Growth factor receptor binding protein-2
GPR1	G protein receptor 1
GRE	Glucocorticoid responsive element
hCG	Human chorionic gonadotropin
HDL	High density lipoprotein
HIF-1	Hypoxia inducible factor-1
HRE	Hypoxia responsive element
HLA	Human leucocyte antigen
HMW	High molecular weight
hPGH	Human placental growth hormone
hPL	Human placental lactogen
IDL	Intermediate density lipoprotein
IFN	Interféron

IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IGF-2	Insulin-like growth factor-2
IGFBP1	Insulin-like growth factor-binding protein 1
IL	Interleukines
IMC	Indice de masse corporelle
IP-10	Proteine interferon 10
IRS-1	Insulin receptor substrate-1
JAK	Janus kinase
JNK	Jun N-terminal kinase
KISS1	Kisspeptin
LAT	System L neutral amino acid transporter
LB	Lymphocyte B
LCPUFA	Long chain polyunsaturated fatty acid
LDL	Low density lipoprotein
LEPR	Leptin receptor
LH	Luteinizing hormone
LIF	Leukemia inhibitory factor
LMW	Low molecular weight
LPS	Liposaccharides
LT	Lymphocyte T
M1	Macrophage sous-type 1
M2	Macrophage sous-type 2
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MC4R	Melanocortin 4 receptor
MCH	Melanin concentrating hormone
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MeAIB	Acide α -méthylaminoisobutyrique
MEC	Matrice extra-cellulaire
MFSD2	Major facilitator superfamily domain-containing protein 2
MLN64	Metastatic lymph node 64
Mkk	Mitogen-activated protein kinase kinase
MMP	Matrix metalloproteinase
MMW	Medium molecular weight
mPR	Membrane progestin receptors
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MVM	Microvillous membrane
NAMPT	Nicotinamide phosphoribosyltransferase
NEFA	Non-esterified fatty acid
NF-κB	Nuclear factor kappa B
NK	Natural killer
NLR	Nod-like receptor
NPY	Neuropeptide Y
OA	Oleic acid
OMS	Organisation mondiale de la santé
PA	Palmitic acid
PAI	Plasminogen activator inhibitor
PCSK1	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 1

PKA	Protein kinase A
PKC	Protein kinase C
PL	Phospholipide
PLC	Phospholipase C
PIGF	Placental growth factor
POMC	Pro-opiomélanocortine
PP13	Protéine placentaire 13
PAPP-A	Protéine A plasmatique associée à la grossesse
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PPRE	PPAR responsive element
PRE	Progesterone-response element
PTP1B	protein tyrosine phosphatase 1B
RARRES2	Retinoic acid receptor responder 2
RCIU	Retard de croissance intra-utérin
RE	Réticulum endoplasmique
ROR1	ROR1 Receptor tyrosine-kinase-like orphan
ROS	Espèce reactive de l'oxygène
SCP-2	Sterol carrier protein-2
SF-1	Steroidogenic factor 1
SHP-2	SH2-containing protein tyrosine phosphatase 2
SIRT-1	Sirtuin 1
SLC	Solute carrier family
SNAT	Sodium-coupled neutral amino acid transporter
SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3
SOS	Son of sevenless
SP1	Specificity protein 1
SR-B1	Scavenger receptor B1
SREBP1	Sterol regulatory element binding protein 1
ST	Syncytiotrophoblaste
sSTAR	Steroidogenic acute regulatory protein
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TA	Tissu adipeux
TAK1	Transforming growth factor β -activated kinase-1
TAT1	T-type amino acid transporter 1
TBC1D1	TBC domain family, member 1
TCPTP	T-cell protein tyrosine phosphatase
TG	Triglycéride
TGF-β	Transforming growth factor beta
Th1	Lymphocyte sous-type Th1
Th2	Lymphocyte sous-type Th2
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase
TLR-4	Toll-like receptor-4
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIBF	Progesterone induced blocking factor
p-FABPpm	Placental-Fatty acid binding protein plasma membrane
PGE2	Prostaglandine E2
PKD-1	Phosphoinositide dependent kinase-1

TNF	Tumor necrosis factor
Treg	Lymphocyte T regulateur
TP53	Tumor protein of 53 kDa
VEGF	Vacular endothelial growth factor
VLDL	Very low density lipoprotein
VMH	Neurones ventro-médians de l'hypothalamus
ZO-1	Zona occludens-1
ZP	Zone pellucide

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : MECANISMES IMPLIQUES DANS LE DEVELOPPEMENT DU TISSU ADIPEUX BLANC	11
FIGURE 2 : PRINCIPAUX FACTEURS SECRETES PAR LE TISSU ADIPEUX BLANC ET LES GRANDES FONCTIONS BIOLOGIQUES ASSOCIEES	13
FIGURE 3 : STRUCTURE DU GENE DE LA LEPTINE.....	14
FIGURE 4 : STRUCTURE PROTEIQUE DE LA LEPTINE	15
FIGURE 5 : EFFETS CENTRAUX DE LA LEPTINE SUR LA MODULATION DE L'HOMÉOSTASIE ÉNERGETIQUE	16
FIGURE 6 : EFFETS DE LA LEPTINE SUR LE MÉTABOLISME DU GLUCOSE ET DES LIPIDES.....	19
FIGURE 7 : STRUCTURE DU GENE DU RECEPTEUR DE LA LEPTINE LEPR	21
FIGURE 8 : ISOFORMES DES RECEPTEURS DE LA LEPTINE.....	23
FIGURE 9 : MECANISMES D'ACTIVATION DE LA VOIE JAK/STAT VIA LEPRB	25
FIGURE 10 : MECANISMES D'ACTIVATION DE LA VOIE MAPK VIA LEPRB	26
FIGURE 11 : MECANISMES D'ACTIVATION DE LA VOIE PI3K VIA LEPRB	27
FIGURE 12 : VOIES DE SIGNALISATION ET RESISTANCE A L'INSULINE	30
FIGURE 13 : STRUCTURE DU GENE DE L'ADIPONECTINE.....	31
FIGURE 14 : STRUCTURES MOLECULAIRES DE L'ADIPONECTINE	33
FIGURE 15 : STRUCTURE DU GENE DU RECEPTEUR DE L'ADIPONECTINE <i>ADIPOR1</i>	36
FIGURE 16 : STRUCTURE DU GENE DU RECEPTEUR DE L'ADIPONECTINE <i>ADIPOR2</i>	37
FIGURE 17 : DOMAINES FONCTIONNELS ET SITES DE PHOSPHORYLATION D'APPL1.....	38
FIGURE 18 : MECANISMES D'ACTIVATION DE LA VOIE DE L'AMPK VIA ADIPOR	39
FIGURE 19 : MECANISMES D'ACTIVATION DE LA VOIE MAPK VIA ADIPOR.....	40
FIGURE 20 : MECANISMES D'ACTIVATION DE LA VOIE PKA VIA ADIPOR	41
FIGURE 21 : MECANISMES D'ACTIONS DES EFFETS INSULINO-SENSIBILISATEURS DE L'ADIPONECTINE	42
FIGURE 22 : EFFETS PHYSIOLOGIQUES DE L'ADIPONECTINE	45
FIGURE 23 : STRUCTURE ET COMPLEXES PROTEIQUES FORMES PAR LA RESISTINE	46
FIGURE 24 : MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DE LA CHERMÉRINE.....	47
FIGURE 25 : MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DE L'APÉLINE	49
FIGURE 26 : DIFFÉRENCIATION DES LIGNAGES IMMUNITAIRES	55
FIGURE 27 : REPRÉSENTATION DE L'ÉXPANSION PHYSIOLOGIQUE ET ANORMALE DU TA	57
FIGURE 28 : ACTIVATION CHRONOLOGIQUE DES CELLULES IMMUNITAIRES LORS DE L'INFLAMMATION DU TISSU ADIPEUX.....	61
FIGURE 29 : EFFETS DE LA LEPTINE SUR LES RÉPONSES IMMUNITAIRES INNÉES ET ADAPTATIVES	67
FIGURE 30 : ÉTAPES PRÉCOCES DU DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE ET SYNCHRONISATION ENDOMÉTRIALE	72
FIGURE 31 : L'IMPLANTATION EMBRYONNAIRE HUMAINE	73
FIGURE 32 : DÉVELOPPEMENT DE LA VILLOSITÉ CHORIALE	74
FIGURE 33 : STRUCTURE DÉFINITIVE DE LA VILLOSITÉ CHORIALE	75
FIGURE 34 : VOIES DE DIFFÉRENCIATION DES LIGNAGES TROPHOBLASTIQUES HUMAINS.....	79
FIGURE 35 : REPRÉSENTATION SCHEMATIQUE DU REMODELAGE DES ARTÈRES SPIRÉLÉES UTERINES	81
FIGURE 36 : PLACENTA À TERME ET ORGANISATION DE LA CIRCULATION SANGUINE FŒTO-MATERNELLE.....	82
FIGURE 37 : DIFFÉRENTS TYPES DE TRANSPORTS DANS LE SYNCYTIOTROPHOBLASTE DU PLACENTA HUMAIN	86
FIGURE 38 : LOCALISATION DES TRANSPORTEURS GLUTs DANS LE SYNCYTIOTROPHOBLASTE ET LES CAPILLAIRES FŒTAUX DU PLACENTA HUMAIN	89
FIGURE 39 : DIFFÉRENTS TYPES DE TRANSPORTEURS D'ACIDES AMINES DANS LE SYNCYTIOTROPHOBLASTE DU PLACENTA HUMAIN.....	92
FIGURE 40 : LOCALISATION DES PRINCIPAUX TRANSPORTEURS D'ACIDES AMINES DANS LE SYNCYTIOTROPHOBLASTE ET LES CAPILLAIRES FŒTAUX DU PLACENTA HUMAIN	96
FIGURE 41 : LOCALISATION DES PRINCIPAUX TRANSPORTEURS DE LIPIDES DANS LE SYNCYTIOTROPHOBLASTE DU PLACENTA HUMAIN	104
FIGURE 42 : RÔLES <i>IN VITRO</i> DE LA LEPTINE ET DE L'ADIPONECTINE DANS LE PLACENTA HUMAIN	124
FIGURE 43 : RÔLES DES CELLULES IMMUNITAIRES À L'INTERFACE FŒTO-MATERNELLE	127
FIGURE 44 : SCHEMA DE LA PERFUSION PLACENTAIRE	146
FIGURE 45 : BILAN DES RESULTATS DE LA THESE	233
FIGURE 46 : BILAN ET PERSPECTIVES DE L'IMPACT DE L'OBESITE MATERNELLE SUR LE STATUT	

INFLAMMATOIRE PLACENTAIRE	235
FIGURE 47 : BILAN ET PERSPECTIVES DE L'IMPACT DE L'OBESITE MATERNELLE SUR L'EXPRESSION PLACENTAIRE DES TRANSPORTEURS DE NUTRIMENTS	237
FIGURE 48 : BILAN DE L'IMPACT DE L'OBESITE MATERNELLE SUR L'ANGIOGENESE PLACENTAIRE.....	239
FIGURE 49 : BILAN ET PERSPECTIVES DE L'IMPACT DE L'OBESITE MATERNELLE SUR LA DIFFERENCIATION TROPHOBLASTIQUE	241

LISTE DES TABLES

TABLE 1 : PRINCIPALES ADIPOKINES DONT LA SECRETION EST AUGMENTEE EN CAS D'OBESITE	69
TABLE 2 : PRINCIPALES ADIPOKINES DONT LA SECRETION EST DIMINUEE EN CAS D'OBESITE	70
TABLE 3 : COMPLICATIONS MATERNELLES DE LA GROSSESSE ASSOCIEES A L'OBESITE	137

Partie 1

INTRODUCTION

Chapitre 1 : Tissu adipeux et obésité

I. Le tissu adipeux

A. Définition et composition du tissu adipeux

Le tissu adipeux (TA) représente en moyenne chez l'Homme, 15 à 20 % du poids corporel et constitue ainsi l'un des tissus les plus abondants de l'organisme. On distingue deux types de tissu adipeux : le **tissu adipeux blanc** et le **tissu adipeux brun**. Ces deux tissus apparaissent chez le fœtus entre 14 et 16 semaines de grossesse, grâce à l'émergence d'un tissu conjonctif lâche non différencié. Un programme de différenciation des cellules mésenchymateuses en pré-adipocytes se met en place qui conduira à l'apparition de vacuoles lipidiques dans le cytoplasme des cellules mésenchymateuses appelées adipocytes. A 28 semaines de grossesse, le TA est considéré comme « mature ». Il est ainsi composé de deux entités distinctes : les **adipocytes** et la **fraction du stroma-vasculaire** qui comprend la matrice extracellulaire dans laquelle se trouve des fibroblastes, des pré-adipocytes, des cellules endothéliales et des **cellules immunitaires** (Curat et al., 2004).

Le tissu adipeux brun formé *in utero* est présent chez le nouveau-né mais régresse rapidement au profit du tissu adipeux blanc qui se développe tout au long de la vie. Le tissu adipeux blanc est un lieu de **stockage et de mobilisation des triglycérides**. Il existe deux types principaux de dépôts de TA blanc : le **TA sous-cutané** qui se dépose principalement dans la région glutéo-fémorale et qui présente une activité métabolique faible et le **TA viscéral** qui se développe dans la région abdominale superficielle ou profonde avec une activité métabolique intense. Contrairement au TA viscéral, le TA sous-cutané n'est pas lié aux comorbidités associées à l'obésité et pourrait même avoir un effet protecteur (Porter et al., 2009).

Le développement du TA peut se dérouler de deux manières possibles. D'une part, par **hypertrophie**, qui consiste en une hausse du volume des adipocytes par augmentation du stockage des lipides. D'autre part, par **hyperplasie**, qui est caractérisée par l'augmentation

du nombre d'adipocytes. L'hyperplasie se produit de manière physiologique lors de périodes de la vie bien définies, dont la dernière moitié de la grossesse, les premières années de vie et au début de la puberté. Au cours de l'obésité, le développement excessif du TA est dû à la fois à l'hyperplasie et à l'hypertrophie adipocytaire (Bays, 2014; Stupin and Arabin, 2014). Cependant, il est important de noter que contrairement à l'hypertrophie, l'hyperplasie est un processus **irréversible (Figure 1)**.

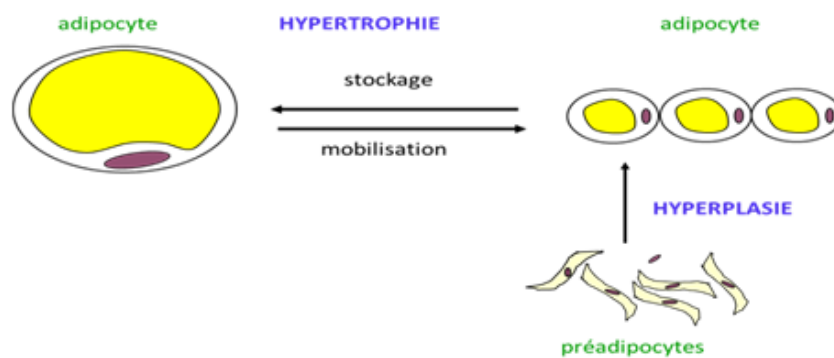


Figure 1 : Mécanismes impliqués dans le développement du tissu adipeux blanc

Il est bien établi que le tissu adipeux (TA) n'est pas uniquement un organe de stockage des lipides mais également un tissu **endocrine actif**.

En effet, le TA est impliqué dans l'homéostasie énergétique, la réponse immunitaire, le contrôle de la pression sanguine, l'hémostase, la régulation de la masse osseuse, ainsi que dans les fonctions thyroïdienne et de reproduction. Tous ces processus sont associés à la synthèse et à la libération de nombreuses hormones et cytokines (Kershaw and Flier, 2004a; Trayhurn and Wood, 2004).

B. Les facteurs synthétisés par le tissu adipeux : généralités

Le tissu adipeux exerce une fonction endocrine très active et secrète une grande variété de facteurs impliqués dans la régulation de grandes fonctions biologiques (**Figure 2**). En effet, le TA est impliqué dans i) la **fonction cardiovasculaire et le système rénine-angiotensine** *via*

la sécrétion des facteurs rénine, angiotensinogène, angiotensine 1 et 2, *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1), *transforming growth factor beta* (TGF- β) et d'adipokines (leptine et adiponectine) ; ii) **la modulation du métabolisme glucido-lipidique** et de la sensibilité à l'insuline *via* la sécrétion de nombreux facteurs dont les adipokines (leptine, adiponectine, résistine), les cytokines (interleukine-6, *tumor necrosis factor α*), des composants du complément (adipsine et *acylation stimulating protein* ASP), les glucocorticoïdes, les acides gras et protéines du métabolisme lipidiques dont la *lipoprotein lipase* (LPL), la *cholesterol ester transferprotein* (CETP), les *non-esterified fatty acid* (NEFA), les apo-lipoprotéines ; iii) **le contrôle de l'inflammation** par la sécrétion des cytokines IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-10 et le facteur *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) et d'adipokines telles que la chémérine, l'apéline, la visfatine, la leptine et l'adiponectine. Cette inflammation et les facteurs impliqués seront détaillés plus amplement dans la suite de ce chapitre en cas d'obésité ; iv) **la modulation de la fonction de reproduction** impliquant la sécrétion d'œstrogènes et la production d'enzymes clés de la stéroïdogénèse telles que la cytochrome p450-aromatase, la 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (17 β -HSD), la 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 (11 β -HSD1) et la sécrétion d'adipokines (leptine et adiponectine) (Henry and Clarke, 2008; Kershaw and Flier, 2004b; Luo and Liu, 2016). La sécrétion et les implications fonctionnelles majeures des adipokines seront détaillées ultérieurement dans cette partie.

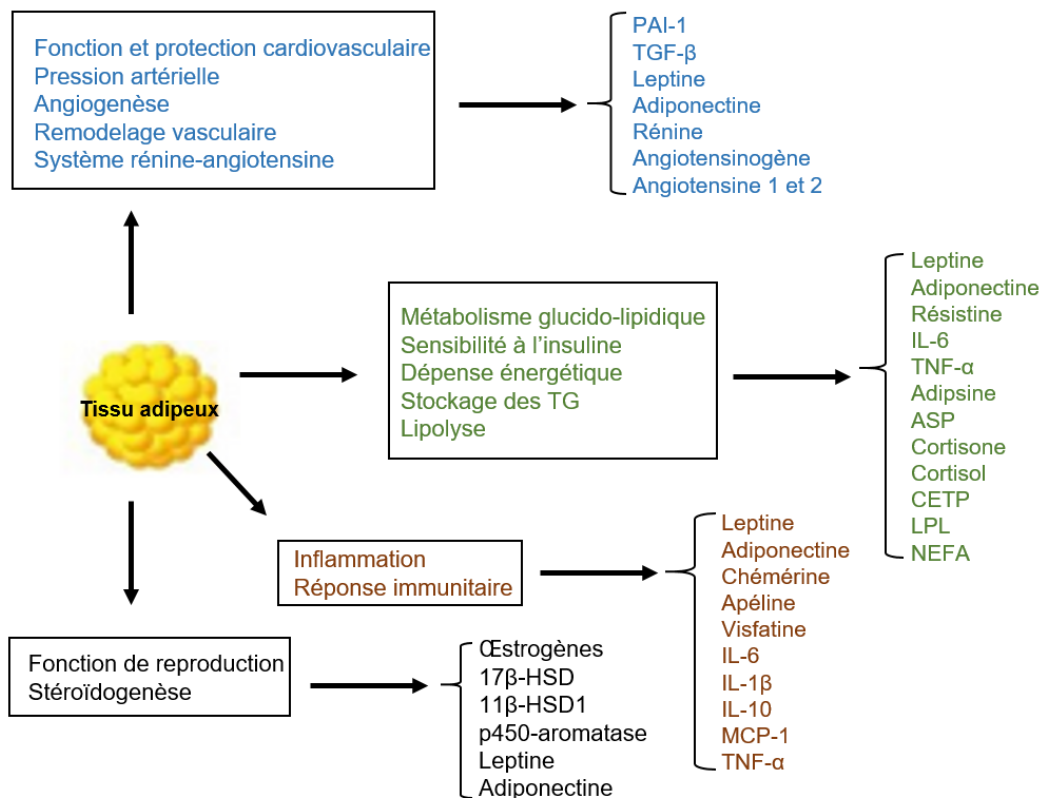


Figure 2 : Principaux facteurs sécrétés par le tissu adipeux blanc et les grandes fonctions biologiques associées

C. Les adipokines

1. La leptine

a) Structure du gène et de la protéine

➤ Le gène de la leptine

Dans les années 1990, l'équipe de Zhang et al, a identifié et caractérisé le gène de la leptine, anciennement appelé *Ob* et aujourd'hui nommé *LEP*. Chez l'Homme, le gène *LEP* constitué de trois exons et deux introns (16,5 kb) est situé sur le locus 7q32 du chromosome 7 (Zhang et al., 1994). La région codante du gène est localisée dans les exons 2 et 3. Chez l'Homme, ces 2 exons sont transcrits en un ARNm de 3,5 kb (Cohen et al., 1996). La région régulatrice est positionnée en -11418 pb à -10618 pb du site d'initiation de la transcription et encadre l'exon 1. Plusieurs éléments régulateurs ont été identifiés dans le promoteur du gène de la

leptine, comprenant des éléments de réponse à l'hypoxie (HRE), à la *specificity protein 1* (SP1), aux glucocorticoïdes (GRE), à l'AMPc (CRE), aux œstrogènes (ERE) et des sites de liaison au facteur CCAAT/enhancer (C/EBP) (Gambino et al., 2012; Grosfeld et al., 2002; Mason et al., 1998) (**Figure 3**).

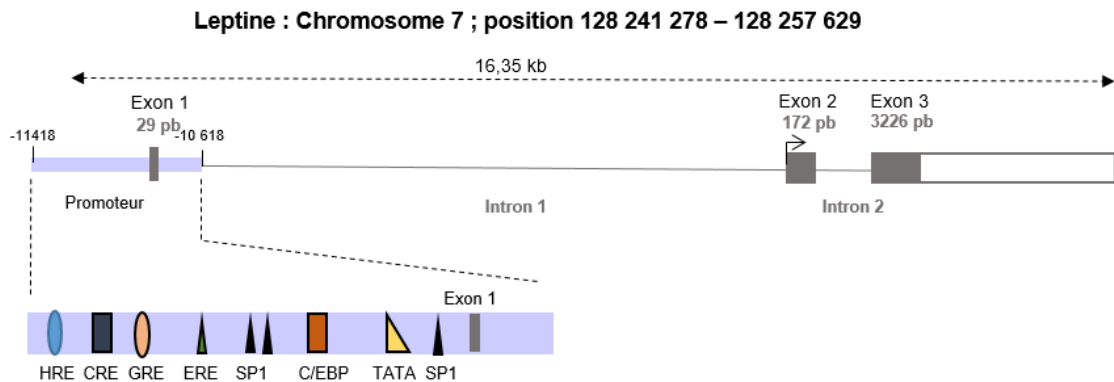


Figure 3 : Structure du gène de la leptine (D'après Grosfeld et al. 2002; Mason et al. 1998; Gambino et al. 2012)

C/EBP : CCAAT/enhancer binding proteins ; CRE : cAMP responsive element ; ERE : estrogen responsive element ; GRE : glucocorticoid responsive element ; HRE : hypoxia responsive element ; SP1 : specificity protein 1

➤ La leptine

La leptine est une protéine formée de 167 acides aminés (18 kDa). Un peptide signal de 21 acides aminés (2 kDa) est clivé pour aboutir à une protéine circulante de 146 acides aminés (16 kDa) comme décrit dans la **Figure 4** (Prolo et al., 1998). Plus de 67 % de la séquence peptidique de cette adipokine est conservée entre les mammifères. En effet, la leptine humaine possède un taux d'homologie de 84 % et 83 % avec les séquences de la leptine murine et de rat, respectivement (Ahima and Flier, 2000; Münzberg and Morrison, 2015). La leptine est formée de quatre hélices α antiparallèles caractéristiques de la famille des cytokines. La leptine possède dans sa partie C-terminale, un pont disulfure entre les cystéines Cys⁹⁶ et Cys¹⁴⁶, qui est crucial pour son intégrité structurale et sa stabilité (Frühbeck, 2006; Zhang et al., 1997). Cette hormone présente des homologies structurales avec différentes cytokines telles que les interleukines (IL), les interférons α et γ (IFN- α , IFN- γ), des facteurs de croissance, tels que l'érythropoïétine et le *leukemia inhibitory factor* (LIF) (La Cava and

Matarese, 2004; Otero et al., 2005; Prolo et al., 1998).

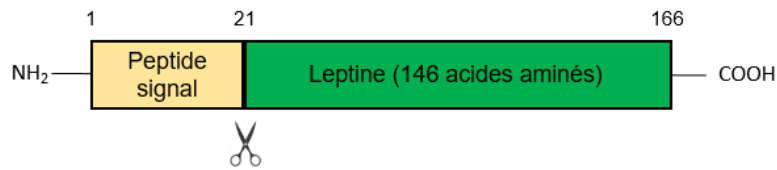


Figure 4 : Structure protéique de la leptine (D'après Prolo, Wong, et Licinio 1998)

b) Rôles physiologiques de la leptine

L'expression de la leptine dans de nombreux tissus explique son implication dans plusieurs fonctions physiologiques telles que le métabolisme énergétique, la reproduction ou encore la vascularisation. Elle serait également un important régulateur de la réponse immunitaire. L'implication de la leptine dans la fonction de reproduction sera détaillée plus précisément dans le **chapitre 3**.

➤ Leptine et homéostasie énergétique

La régulation de la prise alimentaire est la fonction majeure de la leptine qui est décrite comme une hormone satiétogène (Pénicaud et al., 2012). La leptine agit sur les neurones du noyau arqué (ARC) pour contrôler la prise alimentaire. Les neurones du noyau ARC eux-mêmes envoient de nombreuses projections au centre supérieur de l'hypothalamus (l'hypothalamus dorsomédian et le noyau paraventriculaire) impliqué dans l'intégration des signaux. La leptine active d'une part les neurones anorexigènes qui synthétisent la pro-opiomélanocortine (POMC) et le *cocaine and amphetamine regulated transcript* (CART) et d'autre part elle inhibe les neurones orexigènes qui synthétisent le peptide lié à l'agouti (AgRP) et le neuropeptide Y (NPY). Pendant le jeûne, les taux circulants de leptine chutent rapidement, conduisant à l'augmentation de l'expression de l'AgRP et du NPY et à l'inhibition de la synthèse de POMC et CART (Ahima et al., 1999; Cowley et al., 2001). En outre, l'administration centrale de leptine chez la souris augmente l'expression du gène de la corticolibérine ou *corticotropin releasing hormone* (CRH) au niveau du noyau paraventriculaire (Schwartz et al., 1996). La CRH inhibe la prise alimentaire, stimule l'axe hypothalamo-

hypophyso-surrénalien et augmente la thermogénèse dans le TA brun. Par ailleurs, l'hypothalamus latéral contient des neurones exprimant l'hormone *melanin concentrating hormone* (MCH) et des orexines, qui sont diminués par la leptine, ce qui entraîne la suppression de la prise alimentaire. Enfin, la leptine agit également sur les neurones ventro-médians de l'hypothalamus (VMH) qui expriment le facteur *steroidogenic factor-1* (SF-1), ayant pour rôle de moduler la prise alimentaire. Les souris présentant une délétion du SF-1 spécifiquement dans les neurones VMH sont sensibles à l'obésité induite par le régime alimentaire et associée à une thermogénèse altérée (Kim et al., 2011) (**Figure 5**).

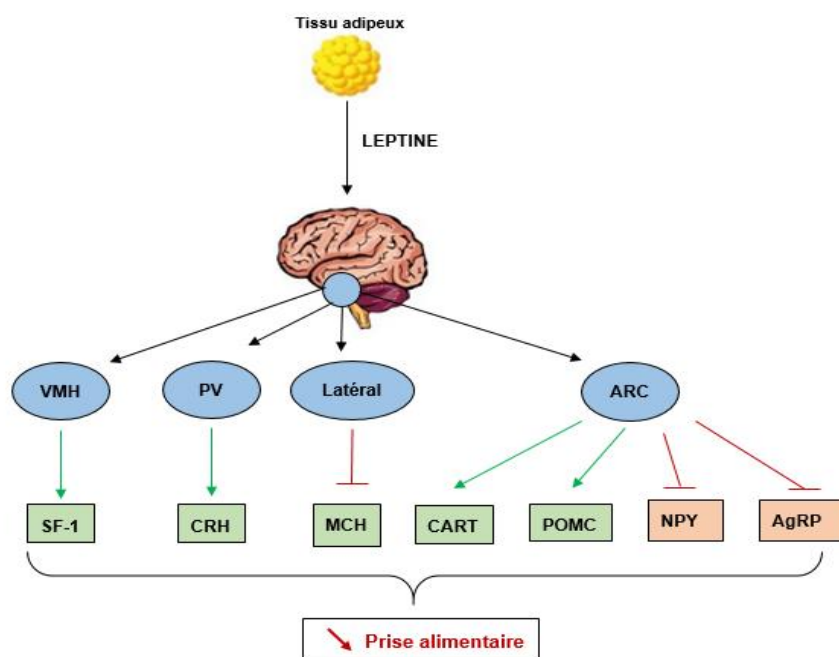


Figure 5 : Effets centraux de la leptine sur la modulation de l'homéostasie énergétique (D'après Pénicaud, Meillon, et Brondel 2012)

AgRP : peptide lié à l'agouti ; ARC : noyau arqué ; CART : cocaine and amphetamine regulated transcript ; MCH : melanin concentrating hormone ; NPY : neuropeptide Y ; POMC : pro-opiomélanocortine ; PV : noyau paraventriculaire ; VMH : noyau ventro-médian

Parallèlement à la régulation de la prise alimentaire, la leptine **augmente la dépense énergétique** *via* le système nerveux sympathique. Chez les rongeurs, la leptine stimule la thermogénèse du TA brun en augmentant l'expression de la protéine de découplage (UCP) -

1 (Haynes et al., 1997; Scarpace et al., 1997). L'effet thermogénique de la leptine est partiellement induit par la suppression de MCH et du facteur de transcription *forkhead box O1* (FoxO1) (Kim et al., 2012; Segal-Lieberman et al., 2003). A la suite de mesures calorimétriques, de l'activité motrice et à l'exposition au froid, des souris dépourvues de leptine (*ob^{-/-}*) et de MCH (double valeur nulle) présentent moins de masse grasse corporelle que les souris *ob^{-/-}*. Alors que les souris mutantes *ob^{-/-}* sont similairement hyperphagiques, les souris doubles nuls présentent une dépense énergétique accrue au repos et une activité locomotrice plus importante par rapport aux souris *ob^{-/-}* (Segal-Lieberman et al., 2003). Ces résultats suggèrent que le MCH régule la dépense énergétique en favorisant de l'activité et de la thermogénèse. De plus, il a été montré que les souris dépourvues de FoxO1 dans les neurones VMH présentent une dépense énergétique accrue avec une élévation de la régulation d'UCP-1 dans le TA brun en raison d'une activité sympathique accrue (Kim et al., 2012).

➤ Leptine et métabolisme glucido-lipidique

Le déficit total en leptine chez les souris *ob^{-/-}* entraîne en particulier une résistance à l'insuline, un diabète et une stéatose. Sur un modèle de souris lipodystrophiques présentant un déficit sévère en leptine, l'administration de leptine entraîne une nette amélioration du métabolisme du glucose et des lipides accompagnée d'une réduction significative de l'accumulation de triglycérides hépatiques et musculaires (Asilmaz et al., 2004; Mulligan et al., 2009; Oral et al., 2002). De plus, chez les souris diabétiques non obèses, l'administration centrale de leptine normalise la glycémie (Fujikawa et al., 2010). Cet effet est dû à une diminution de la production de glucose hépatique et à une augmentation l'absorption périphérique de glucose (Berglund et al., 2012). Enfin, sur un modèle souris *db^{-/-}*, la restauration de l'expression du récepteur de la leptine (LEPR) dans les noyaux arqués diminue les taux circulants d'insuline et de glucose (Coppari et al., 2005). **L'ensemble de ces résultats démontre que la leptine exerce un effet hypoglycémiant.**

La leptine régule également le métabolisme des lipides. L'administration centrale de leptine i)

inhibe la lipogenèse *de novo* et ii) favorise la lipolyse *via* la stimulation du système nerveux sympathique chez le rat et l'oxydation des acides gras hépatiques (Buettner et al., 2008; Gallardo et al., 2007). Ces effets mettent en jeu l'activation du facteur *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR) α . En effet, des études réalisées *in vivo*, chez la souris invalidée pour le gène PPAR α montre une lipolyse fortement diminuée comparée aux souris contrôles (Lee et al., 2002). Dans le muscle squelettique de rongeur, la leptine stimule également l'oxydation des acides gras, en activant la *5'-AMP-Activated Protein Kinase* (AMPK) et diminue l'accumulation de métabolites lipidiques associés à la lipotoxicité (Minokoshi et al., 2002). Cependant, une modification de l'expression du récepteur de la leptine (LEPR) dans les organes périphériques n'a pas d'impact significatif sur le métabolisme des lipides. En effet, l'équipe de Guo et al, n'a pas observé de changement dans la balance énergétique, la thermorégulation et la sensibilité à l'insuline sur un modèle souris dont le récepteur de la leptine est intact dans le cerveau, mais présente une délétion quasi complète du domaine de signalisation dans le foie, le tissu adipeux et l'intestin grêle. Ces résultats suggèrent que la leptine agit principalement dans le cerveau pour influencer le métabolisme des lipides et que la signalisation de la leptine périphérique seule n'est pas suffisante pour contrôler le métabolisme lipidique (Guo et al., 2007) (**Figure 6**).

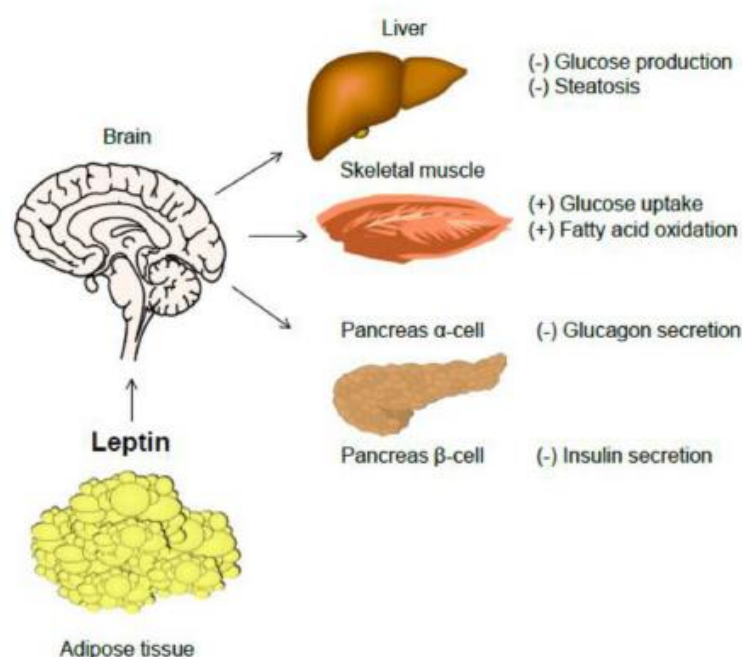


Figure 6 : Effets de la leptine sur le métabolisme du glucose et des lipides (D'après Park et Ahima. 2015)

La leptine contrôle, *via* la modulation du système nerveux autonome, la production de glucose hépatique, l'absorption de glucose par le muscle et les sécrétions de glucagon et d'insuline. Enfin, elle stimule l'oxydation des acides gras dans le muscle.

c) Synthèse et régulation de l'expression de la leptine

➤ La synthèse de la leptine

La leptine est une adipokine synthétisée majoritairement par le TA blanc (Münzberg and Morrison, 2015). De récentes études l'ont décrite comme nouvelle hormone placentaire à part entière. Dans une moindre mesure, elle est également synthétisée par l'hypophyse, l'estomac, l'intestin, le muscle squelettiques et l'ovaire (Cinti et al., 2000; Harris, 2000; Morton et al., 1998; Rayner and Trayhurn, 2001). Dans les adipocytes humains, la leptine présente une localisation subcellulaire bien précise. En effet, cette adipokine semble être stockée sous forme de « pools » près de la membrane adipocytaire. Ces « pools » sont retrouvés augmentés dans le TA sous-cutané au cours de l'obésité (Russell et al., 2001).

L'expression de la leptine est variable selon la localisation du TA concerné. En effet, chez l'Homme, la leptine est plus exprimée dans le TA sous cutané que dans le TA viscéral (Kershaw and Flier, 2004b). Les niveaux de sécrétion de la leptine sont principalement le reflet de la taille des adipocytes. En effet, il a été démontré que les adipocytes de plus grande taille produisent davantage de leptine (Hamilton et al., 1995).

La leptine est libérée dans la circulation selon un rythme circadien. Les taux circulants de leptine sont compris entre 1 et 30 ng/ml chez l'adulte sain et de poids normal (Prolo et al., 1998). Elle circule sous forme libre et/ou couplé à d'autres protéines plasmatiques (Landt, 2000; Ronti et al., 2006). Les taux sériques de la leptine sont corrélés positivement à l'indice de masse grasse chez l'Homme et les rongeurs (Galic et al., 2010; Senthil Kumar et al., 2014). Ainsi, chez l'Homme, l'obésité conduit à une hyperleptinémie pouvant atteindre 100 ng/ml (Galic et al., 2010; Koch et al., 2014). L'hyperleptinémie chez les sujets obèses semble être davantage associée à l'hypertrophie qu'à l'hyperplasie adipocytaire (Couillard et al., 2000).

Cependant, l'expression du gène de la leptine est également soumise à un contrôle nutritionnel et hormonal.

➤ La régulation nutritionnelle de la synthèse de leptine

Après un repas, les taux circulants de leptine augmentent et à l'inverse, le jeûne induit une forte diminution de la leptinémie (Coll et al., 2007). Ces observations suggèrent que l'expression du gène *LEP* est régulée par les nutriments (glucose et acides gras) et/ou l'insuline. De nombreux travaux montrent que l'insuline est un régulateur clé de l'expression du gène *LEP*. En effet, dans des cultures *in vitro* d'adipocytes humains, l'insuline stimule l'expression de la leptine (ARMM et protéine) (Hardie et al., 1996). *In vivo* chez l'Homme, une hyperinsulinémie provoquée induit une augmentation de la leptinémie au long terme (Boden et al., 1997; Vidal et al., 1996). Enfin, des études réalisées chez le modèle rat et chez l'Homme suggèrent que l'effet positif de l'insuline sur la sécrétion de leptine n'est pas direct mais lié à une augmentation du métabolisme du glucose et de son transporteur GLUT4 dans le TA (Moreno-Aliaga et al., 2001; Senthil Kumar et al., 2014).

Contrairement au glucose, les acides gras exercent des effets négatifs sur la sécrétion de leptine. Ces effets sont médiés *via* l'activation du facteur de transcription PPAR γ qui inhibe l'expression du gène *LEP*. Outre le statut nutritionnel, la sécrétion de leptine est également régulée par certaines hormones.

➤ La régulation hormonale de la synthèse de leptine

Les hormones stéroïdes, dont les récepteurs sont exprimés dans le TA modulent l'expression du gène *LEP* et la sécrétion de leptine. En effet, très rapidement après la découverte du gène *LEP*, il a été mis en évidence un dimorphisme sexuel de la leptinémie avec une plus forte sécrétion de leptine chez la femme que chez l'homme. Ce dimorphisme sexuel de la leptinémie s'explique par un effet direct des œstrogènes sur l'expression du gène *LEP* (Fungfuang et al., 2013; Gambino et al., 2010; Machinal-Quélin et al., 2002).

Dans l'espèce humaine, les glucocorticoïdes modulent également l'expression du gène *LEP*.

En effet, il a été démontré qu'un traitement de courte durée (48h) à la dexaméthasone induit un doublement de la leptinémie (Larsson and Ahrén, 1996). *In vitro*, l'effet stimulant de la dexaméthasone sur l'expression de la leptine est plus importante dans des adipocytes d'origine féminine que masculine. Ces résultats suggèrent que les corticoïdes pourraient contribuer au dimorphisme sexuel de la leptinémie (Saad et al., 1997; Williams et al., 2000). Enfin, une corrélation positive entre la leptine, les taux circulants de TNF- α et l'indice de masse corporelle (IMC) a été observée chez l'Homme (Ranganathan et al., 1998).

d) Les récepteurs et les voies de signalisation de la leptine

➤ Le gène *LEPR*

Chez l'Homme, le gène *LEPR* constitué de 20 exons et 19 introns (221 kb) est positionné sur le locus 1p31 du chromosome 1. La région codante du gène est localisée dans les exons 3 à 20. Le promoteur du gène *LEPR* est situé en - 10170 pb et - 9894 pb en amont du site d'initiation de transcription et encadre l'exon 1 (**Figure 7**). Certains éléments de réponse, identiques à ceux présents sur le promoteur de la leptine ont été identifiés. Il s'agit des éléments de réponse SP1, GRE, *PPAR responsive element* (PPRE) et à *insulinoma-associated factors* (INS) notamment (Palou et al., 2011).

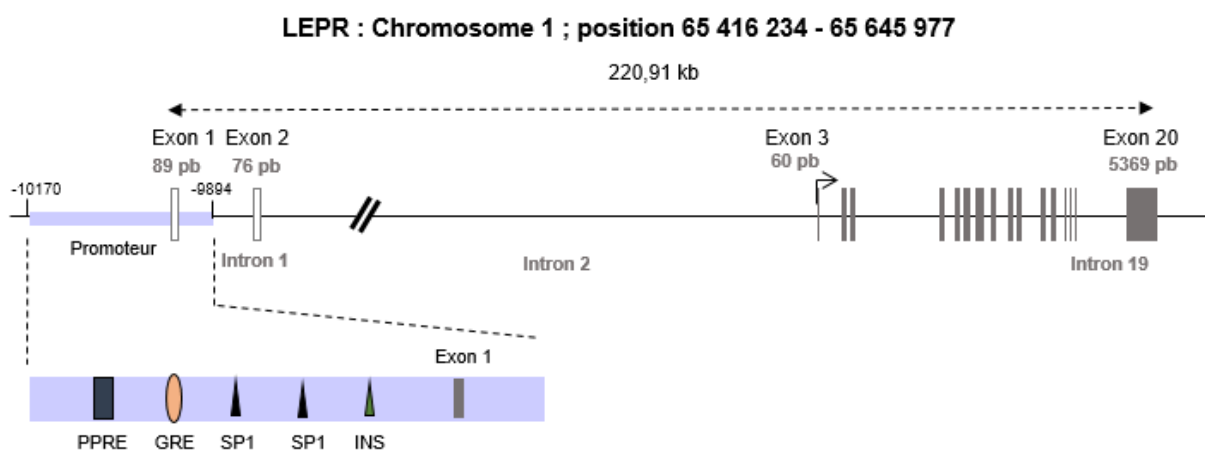


Figure 7 : Structure du gène du récepteur de la leptine *LEPR* (D'après Palou et al. 2011)

GRE : glucocorticoid responsive element ; INS : insulinoma-associated factors ; PPRE : PPAR responsive element ; SP1 : specificity protein 1

➤ La protéine LEPR

La leptine agit en se liant à un récepteur transmembranaire appelé chez l'Homme, dans un premier temps Ob-R, puis plus récemment LEPR (Tartaglia et al., 1995). Ce récepteur appartient à la superfamille des récepteurs des cytokines de classe I. En effet, le récepteur de la leptine présente des similarités structurales avec la sous unité gp130 transductrice du signal des récepteurs des interleukines et des interférons (IFN) (Ahima and Flier, 2000; Tartaglia et al., 1995).

Six isoformes du récepteur *LEPR*, issues d'un épissage alternatif de la partie 3' du message, ont été mise en évidence. Ces isoformes sont nommées LEPRa, LEPRb, LEPRc, LEPRd, LEPRe et LEPRf (Gorska et al., 2010) (**Figure 8**). Ces différentes isoformes possèdent en commun un domaine N-terminal extracellulaire de liaison à la leptine de 816 acides aminés et un domaine transmembranaire de 34 acides aminés (à l'exception de LEPRe). Le domaine N-terminal extracellulaire possède un motif peptidique Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWS), deux domaines *cytokines receptor homology domain* (CHD) et quatre domaines fibronectine de type 3 (Fn3), caractéristiques des récepteurs aux cytokines de classe I (Frühbeck, 2006). En revanche, toutes les isoformes du récepteur *LEPR* divergent par leur domaine intracellulaire qui est constitué de 34 à 302 acides aminés (Gorska et al., 2010). L'isoforme la plus longue, LEPRb, présente un domaine cytoplasmique qui contient les motifs d'activation et de transduction du signal (des résidus tyrosines) (Myers et al., 2008). Le récepteur LEPRb est fortement exprimé dans l'hypothalamus et dans de nombreux tissus périphériques tels que le TA, le foie, l'endomètre, les cellules immunitaires (macrophages, lymphocytes...) (Caldefie-Chezet et al., 2001; Wada et al., 2014).

Les isoformes courtes LEPRa, LEPRc, LEPRd et LEPRf comportent un domaine intracellulaire tronqué, d'environ 30 à 40 acides aminés. Ces récepteurs semblent médier le transport et la dégradation de la leptine. Cependant, peu d'études se sont intéressées au rôle possible de ces isoformes dans la transduction du signal de la leptine. LEPRa, l'isoforme courte la plus étudiée, est exprimée par de nombreux tissus tels que les poumons, les reins, le foie (Fei et

al., 1997). L'équipe de Bjorbaek et al, ont mis en évidence que LEPRa est capable d'activer la voie JAK sur une lignée cellulaire COS transfectée avec ce récepteur (Bjørnbæk et al., 1997). LEPRa participe également au transport actif de la leptine du sang vers le cerveau à travers la barrière hémato-encéphalique (Hileman et al., 2002). L'expression de LEPRc est rapportée dans le cortex, l'hypothalamus, les micro-vaisseaux et le plexus choroïde. La distribution tissulaire de l'isoforme LEPRd reste indéterminée (Fei et al., 1997). Ces deux isoformes c et d semblent être impliquées dans l'élimination de la leptine de la circulation sanguine. LEPRe est une isoforme sécrétée soluble. L'ARNm correspondant à cette isoforme n'a pas été mis en évidence chez l'Homme (Ge et al., 2002). Cependant sa protéine est bien retrouvée dans le plasma humain (Wu et al., 2002). Ainsi, dans le sérum, LEPRe est la protéine de transport majoritaire de la leptine (Lammert et al., 2001). La fonction de cette isoforme serait de réduire la proportion de leptine libre dans le plasma et ainsi de réguler son activité biologique. La forme soluble LEPRe est exprimée par la plupart des tissus, notamment par le TA, les gonades, le foie et la rate (Campfield et al., 1995). Elle représente donc un important régulateur de la leptinémie et peut expliquer les variations rapides des taux circulants de leptine en fonction de l'état nutritionnel de l'individu. Enfin chez le rat, l'expression de LEPRf a été mesurée dans le cerveau, le foie, l'estomac, les reins et le cœur (Wang et al., 1996).

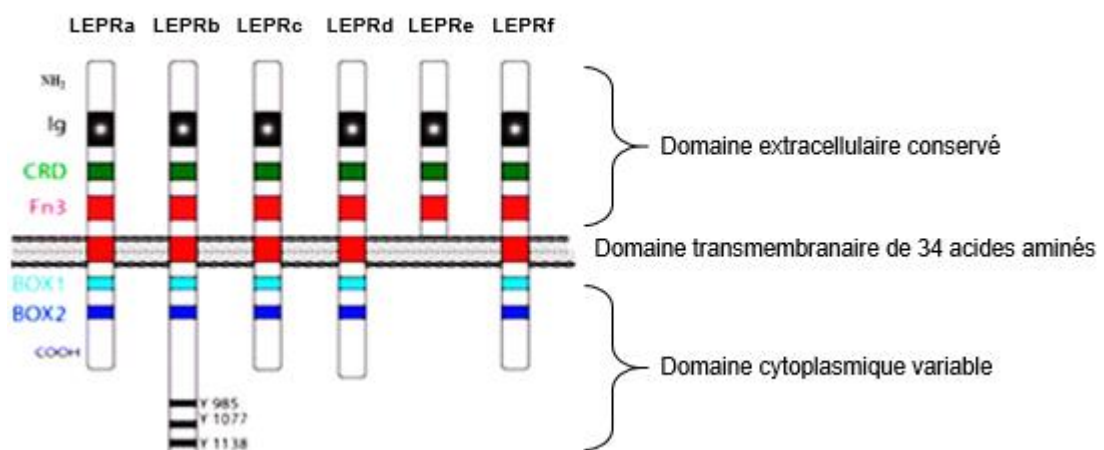


Figure 8 : Isoformes des récepteurs de la leptine (D'après Ahima and Flier. 2000)

Les récepteurs de la leptine (LEPRa-f) dérivent de l'épissage alternatif du même gène *LEPR*. LEPRb est la forme longue du récepteur qui est principalement responsable de la transduction du signal.

➤ Voies de signalisation de la leptine

La forme la plus active connue étant le LEPRb, les voies de signalisation décrites par la suite feront référence à la transduction du signal *via* cette isoforme.

La fixation de la leptine à son récepteur entraîne la formation d'homodimères indispensables à son activation. Trois voies de signalisation majoritaires ont été décrites lors de l'activation du récepteur de la leptine : la voie janus kinase (JAK) / signal transducer of activation (STAT), la voie *mitogen activated protein kinase* (MAPK/ERK1/2) et la voie phosphoinositide 3-kinase (PI3K/Akt) (Frühbeck, 2006).

La voie JAK/STAT est la voie majoritaire activée par LEPRb. Il existe quatre isoformes de protéines à activité tyrosine kinase telles que JAK1, 2, 3 et TYK2 (Tyrosine Kinase). Il a été montré que principalement JAK2 interagit avec LEPRb. L'initiation de la transduction du signal se réalise après l'interaction de JAK2 avec des domaines très conservés du récepteur à la leptine, dont le domaine *Box 1*, riche en proline (Cirillo et al., 2008). Une fois activée, la protéine JAK2 phosphoryle des résidus tyrosines spécifiques du récepteur LEPRb (**Tyr⁹⁸⁵**, **Tyr¹⁰⁷⁷**, **Tyr¹¹³⁸**) ce qui permet la liaison des protéines STAT (Frühbeck, 2006). Les protéines STAT sont recrutées sur les résidus tyrosines phosphorylées Tyr¹⁰⁷⁷ et Tyr¹¹³⁸ *via* leur domaine *Src-like homology 2* (SH2). Les protéines STAT sont phosphorylées par JAK2. Une fois activées, les STAT se dissocient du récepteur et s'assemblent en dimères pour être transloquées dans le noyau. La co-expression de chaque protéine STAT avec LEPRb a révélé que les protéines STAT3 et STAT5 sont principalement activées par la leptine. STAT5 est recrutée sur les Tyr¹⁰⁷⁷ et Tyr¹¹³⁸, et STAT3 est recrutée spécifiquement sur le résidu Tyr¹¹³⁸ (Frühbeck, 2006). En effet, des souris exprimant un récepteur LEPRb muté pour la Tyr¹¹³⁸ sont incapables de recruter STAT3 et développent une obésité accompagnée d'une insulino-résistance (Bates et al., 2003; Cirillo et al., 2008). STAT5 est décrite comme un facteur de transcription impliqué dans le contrôle des fonctions de reproduction. STAT3 est décrite comme médiateurs des principaux effets physiologiques de la leptine, dont l'homéostasie énergétique et les fonctions neuroendocrines (Moon et al., 2013) (**Figure 9**).

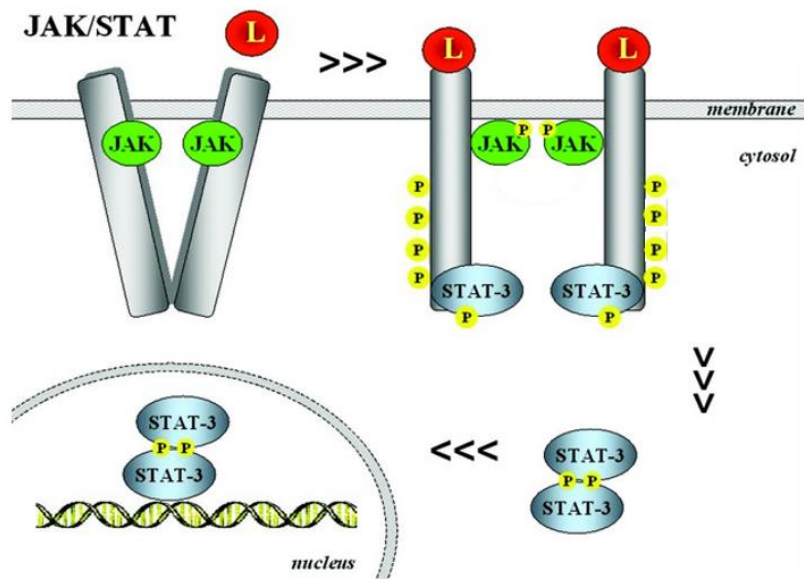


Figure 9 : Mécanismes d'activation de la voie JAK/STAT via LEPRb (D'après Frühbeck. 2006)

La liaison de la leptine (L) au récepteur LEPRb, conduit à l'activation de JAK, qui elle-même entraîne la phosphorylation des STAT3. JAK : janus kinases ; STAT3 : signal transducers and activators of transcription 3.

La voie MAPK est également activée par la leptine. La stimulation de LEPRb par la leptine entraîne le recrutement de JAK2 puis la phosphorylation du récepteur sur le résidu tyrosine **Tyr⁹⁸⁵**, permettant l'activation de la protéine (*SH2*)-containing protein tyrosine phosphatase 2 (SHP-2). Par la suite, SHP-2 recrute la protéine adaptatrice *growth factor receptor binding protein-2* (Grb-2) qui activera à son tour la protéine *son of sevenless* (SOS). Enfin, SOS stimule la protéine Ras, déclencheur de la cascade des MAPK. L'activation consécutive de Ras, Raf, MEK1/2 conduit à la translocation nucléaire de la protéine *extracellular signal regulated Kinase 1/2* (ERK1/2) afin de réguler l'expression de gènes cibles tels que *c-fos* et *egr-1* impliqués dans les phénomènes de survie, de prolifération et de différenciation cellulaires (Horgan and Stork, 2003). La leptine est également capable d'activer les protéines p38-MAPK et c-Jun N-terminal Kinase (JNK), impliquées dans des phénomènes de stress cellulaire (Bouloumie et al., 1999; Shin et al., 2005). Enfin, la phosphorylation du récepteur LEPRb sur le résidu tyrosine **Tyr⁹⁸⁵**, permettant l'activation de la phospholipase C (PLC), conduit à l'activation de la PKC. La PKC peut alors phosphoryler de nombreux facteurs cellulaires sur des résidus

serine/thréonine, notamment la protéine JNK qui active le facteur de transcription c-jun (**Figure 10**). La voie MAPK, activée par la leptine, joue un rôle prépondérant dans l'homéostasie énergétique de la cellule. Elle stimule la production d'énergie en activant le transport du glucose et l'oxydation des acides gras et limite la consommation énergétique en inhibant la lipogenèse, la synthèse protéique et la néoglucogenèse.

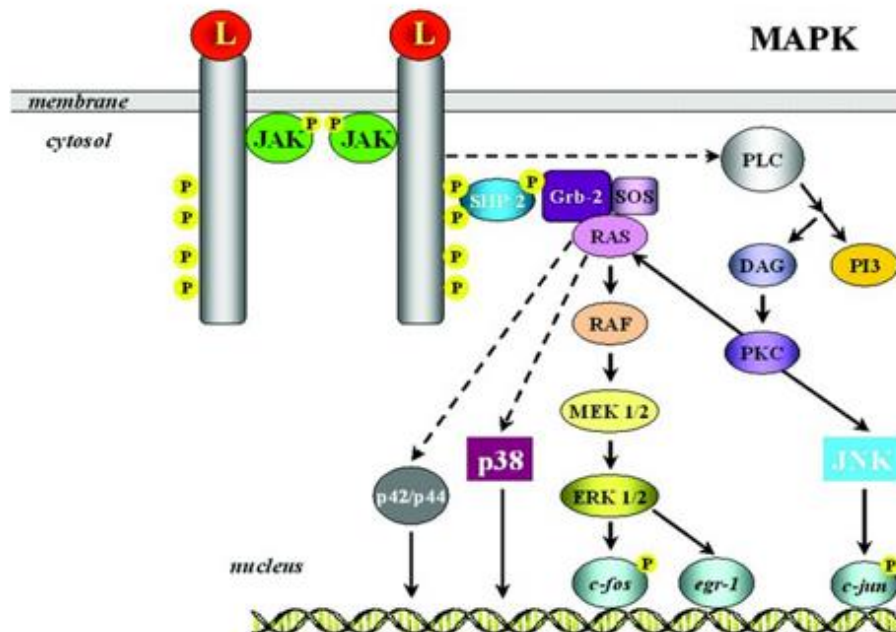


Figure 10 : Mécanismes d'activation de la voie MAPK via LEPRb (D'après Frühbeck. 2006)

La liaison de la leptine (L) au récepteur LEPRb conduit à sa phosphorylation sur le résidu Y⁹⁸⁵ par JAK2. Cette étape permet la liaison de la protéine SHP-2 qui elle-même interagit avec la protéine adaptatrice Grb2 et avec SOS ce qui conduit à l'activation de la voie Ras / Raf / MAPK. DAG : diacylglycerol ; ERK : extracellular-signal-regulated kinase ; Grb-2 : growth factor receptor binding-2 ; MEK : MAP/ERK kinase ; PI3 : phosphatidyl-inositol 3 ; PLC : phospholipase C ; PKC : protein kinase C ; SOS : son of sevenless ; SHP-2 : Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase 2.

La voie PI3K est une voie activée par un grand nombre de ligands dont l'insuline. La leptine est également capable de réguler certains acteurs de cette voie. La fixation de la leptine à son récepteur permet le recrutement et l'activation de JAK2 qui active directement les protéines *insulin receptor substrate* (IRS-1 et IRS2) initiatrices de la voie PI3K (Bjørnbæk et al., 1997; Frühbeck, 2006). Une fois activées, les protéines IRS-1 et IRS-2 stimulent l'activité de la PI3K

qui phosphoryle les phosphatidylinositols (tel que PIP2) de la membrane plasmique pour générer le phosphatidylinositol triphosphate (PIP3). Le PIP3 sert alors de substrat à la *phosphoinositide dependent kinase-1* (PDK-1) qui active à son tour les protéines kinases B (PKB ou Akt) et C (PKC) (Frühbeck, 2006). La kinase Akt, protéine majeure de la voie de signalisation IRS/PI3K, est impliquée principalement dans des phénomènes de prolifération et de survie cellulaire *via* l'activation de protéines telles que *mammalian target of rapamycin* (mTOR), *nuclear factor-kappa B* (NF-κB) et *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) (Mattioli et al., 2009). Cette voie semble également être impliquée dans la régulation des fonctions neuroendocrines et dans les phénomènes de résistance à la leptine et à l'insuline. De plus, l'activation de la PKC par la leptine peut conduire à l'activation de la protéine Raf, suggérant un lien entre la voie PI3K et la voie des MAPK (Moon et al., 2013) (**Figure 11**).

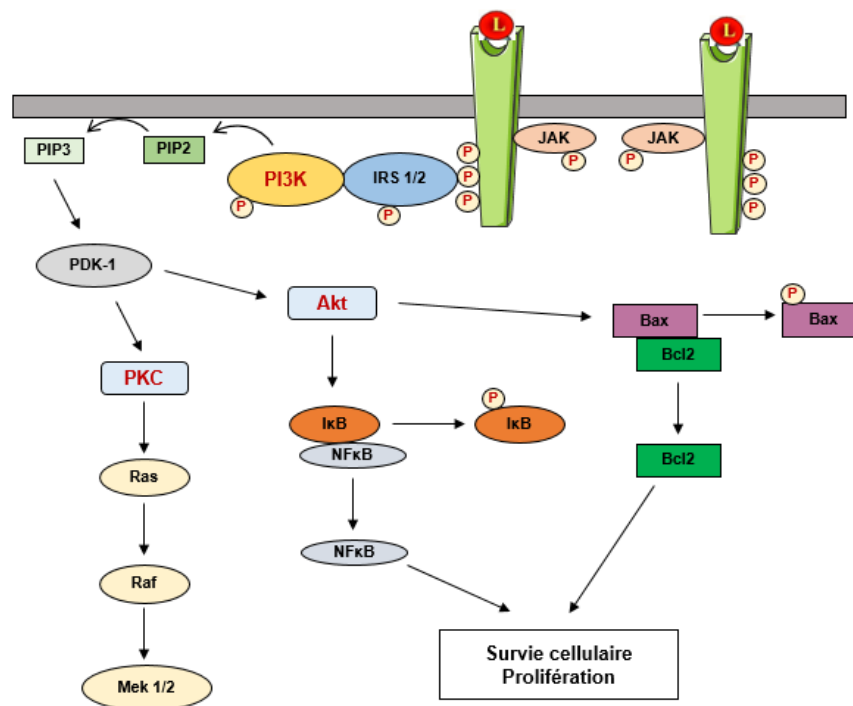


Figure 11 : Mécanismes d'activation de la voie PI3K via LEPRb (D'après Frühbeck et al. 2006 et Carduner et al. 2013)

La PI3K activée en présence de leptine (L), permet l'activation de l'Akt impliquée dans la survie cellulaire. D'autre part, la PI3K peut activer la PKC qui est impliquée dans le cross-talk avec les voies des MAPK.

Bcl2 : B-cell lymphoma 2 ; Bax : Bcl2-associated X ; IκB : Inhibitor of kappa B ; IRS : insulin receptor substrate ; NF-κB : nuclear factor-kappa B ; JAK : janus kinase ; MEK : MAP/ERK kinase ; PDK-1 : phosphoinositide-

dependent kinase-1 ; PKC : protéine kinase C ; PI3K : phosphoinositide 3-kinase ; PIP2 : phosphatidylinositol bisphosphate ; PIP3 : phosphatidylinositol trisphosphate

Enfin, la leptine peut activer la voie de la **5'-AMP-Activated Protein Kinase (AMPK)**, une enzyme clé impliquée dans le contrôle du métabolisme énergétique. L'AMPK est considérée comme un senseur du statut énergétique de la cellule. En effet, l'AMPK participe au maintien de l'homéostasie énergétique en activant les voies cataboliques productrices d'ATP et en inhibant les voies anaboliques consommatrices d'énergie (Foretz et al., 2006). L'activation de l'AMPK par la leptine conduit à la stimulation de l'oxydation des acides gras et de l'entrée du glucose dans la cellule. La voie de l'AMPK stimulée par la leptine joue également un rôle important dans la régulation de la prise alimentaire et dans les phénomènes de prolifération et de survie cellulaire (Moon et al., 2013).

Cependant, la voie de signalisation de la leptine peut être interrompue lorsque les concentrations circulantes de leptine sont élevées (cas de l'obésité) ce qui conduit à une **leptino-résistance centrale**. Plusieurs mécanismes sont à l'origine du blocage de la voie de signalisation de la leptine.

Premièrement, la leptine induit l'expression d'un gène cible codant la protéine *suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3). **La protéine SOCS3** inhibe l'activité de JAK2 en se liant directement à cette protéine (Bjørbaek et al., 1998, 1999). De plus, SOCS3 se lie à la Tyr⁹⁸⁵ du récepteur LEPR^b ce qui empêche le recrutement de la protéine (SHP-2) et donc l'activation de la voie de signalisation des MAPKinases impliquée dans le contrôle de la prise alimentaire (Bjørbaek et al., 2001; Björnholm et al., 2007). Dans le modèle murin, l'inhibition de SOCS3 spécifiquement dans les neurones POMC, limite la leptino-résistance. En revanche, la surexpression de SOCS3 dans les neurones POMC conduit à une résistance à la leptine et à une progression de l'obésité (Mori et al., 2004; Peralta et al., 2002). **Les protéines tyrosines phosphatases 1B (PTP1B)** et *T-cell protein tyrosine phosphatase* (TCPTP) participent également au mécanisme de la leptino-résistance. La PTP1B déphosphoryle spécifiquement JAK2 et TCPTP déphosphoryle les protéines STAT1 et STAT3 (St-Pierre and Tremblay,

2012). Il a été mis en évidence que l'expression de PTP1B et de TCPTP dans l'hypothalamus est plus élevée chez les souris rendues obèses par un régime alimentaire par comparaison à des souris normo-pondérées. Ces résultats confirment que PTP1B et TCPTP contribuent à la résistance à la leptine et à la progression vers l'obésité (Loh et al., 2011; Morrison et al., 2007). Par ailleurs, le transport cérébral de la leptine est diminué chez l'Homme et la souris obèses. En effet, d'une part l'équipe de Banks et al, a observé chez la souris une saturation du récepteur LEPRa menant à une baisse de l'efficacité du transport au travers de la barrière hémato-encéphalique. D'autre part, le récepteur soluble LEPRe antagonise le passage de la leptine au travers de la barrière hémato-encéphalique de la souris en réduisant la liaison et l'endocytose de la leptine au récepteur LEPRa (Banks et al., 1999; Hileman et al., 2002; Tu et al., 2008).

Enfin, il semble que le trafic de LEPRb à la surface membranaire soit également impliqué dans le mécanisme de leptino-résistance. La localisation membranaire de LEPRb dépend de multiples facteurs et en particulier des protéines chaperonnes. Chez l'Homme et la souris obèses, le trafic de LEPRb et la signalisation de la leptine sont interrompus par un dysfonctionnement des protéines chaperonnes (Rahmouni et al., 2008; Seo et al., 2009). De plus, LEPRb est internalisée constitutivement par endocytose de manière indépendante du ligand et chez les individus obèses, LEPRb semble subir une endocytose plus importante que les individus normo-pondérés (Belouzard et al., 2004) (**Figure 12**).

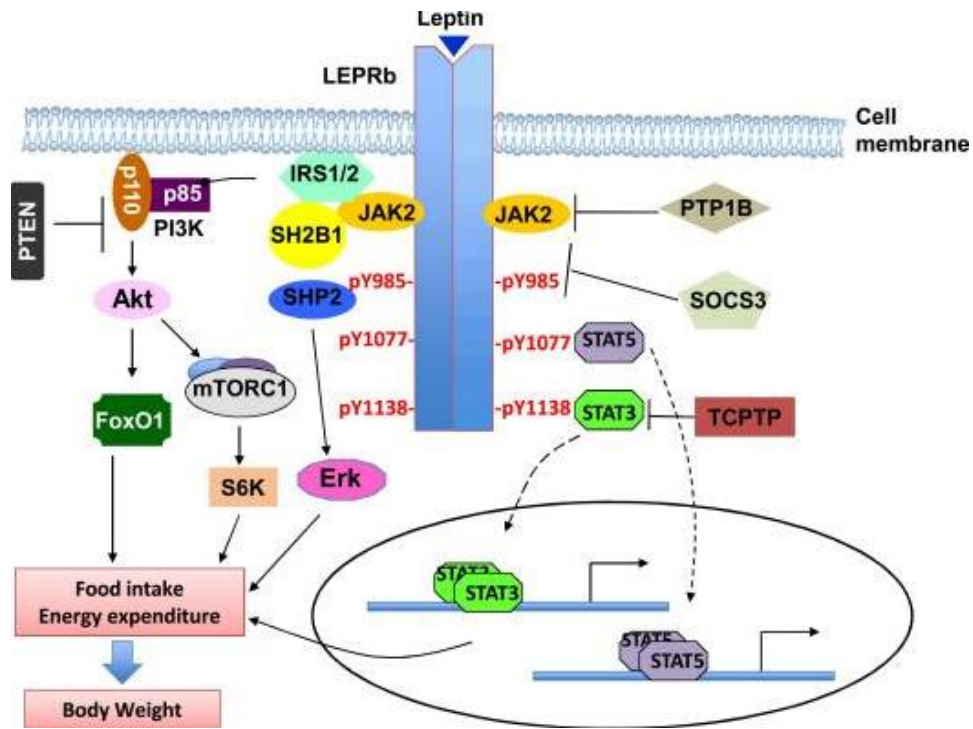


Figure 12 : Voies de signalisation et résistance à l'insuline (D'après Zhou et Rui. 2014)

La signalisation LEPRb est régulée négativement à la fois par SOCS3, PTP1B, TCPTP et positivement par SH2B1. De nombreux facteurs, notamment l'hyperleptinémie, l'inflammation et l'autophagie défectueuse, contribuent à la résistance à la leptine. FoxO1 : Forkhead box *protein* O1 ; IRS : insulin receptor substrate ; mTORC1 : mammalian target of rapamycin complex 1 ; PTEN : phosphatase and TENsin homolog ; PTP1B : protéines tyrosines phosphatases 1B ; STAT : signal transducer and activator of transcription ; SH2B1 : Src homology 2 B adaptor protein 1 ; SHP2 : Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase 2 ; SOCS3 : suppressor of cytokine signaling 3 ; TCPTP : T-cell protein tyrosine phosphatase

2. L'adiponectine

a) Structure du gène et de la protéine

➤ Le gène de l'adiponectine

Le gène de l'adiponectine appelé *ADIPOQ* est situé sur le locus 3q27 du chromosome 3. Il s'agit d'un gène de 16 kb composé de trois exons et deux introns (Takahashi et al., 2000). Le transcrit primaire a une taille de 4.5 kb (Maeda et al., 1996). Comme le montre la **figure 13**, la région promotrice est située en position - 2667 et + 41 du site d'initiation de transcription, encadrant ainsi l'exon 1. De manière surprenante, le promoteur ne possède pas de séquence TATA mais présente d'autres éléments de réponse à de nombreux facteurs transcriptionnels (Liu and Liu, 2010).

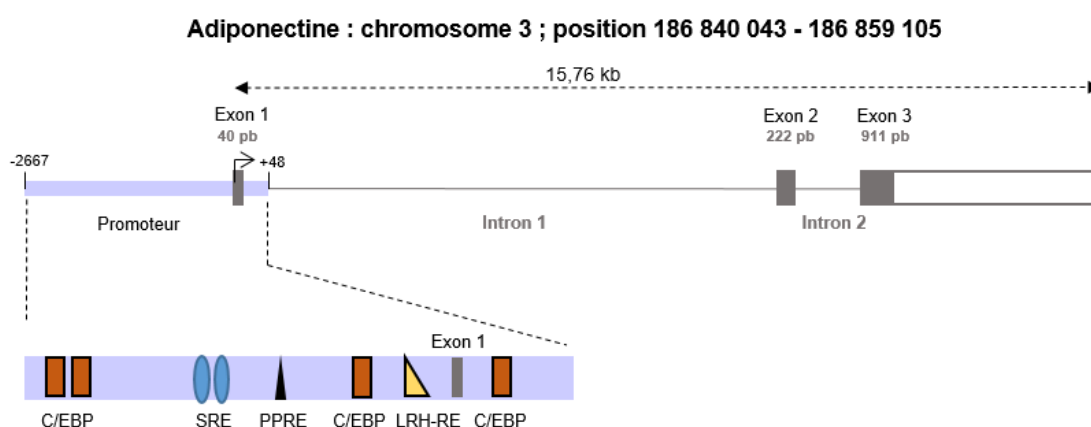


Figure 13 : Structure du gène de l'adiponectine

C/EBP : CCAAT/enhancer binding proteins ; LRH-RE : liver receptor homolog-responsive element ; PPRE : PPAR responsive element ; SRE : sterol regulatory element

➤ L'adiponectine

L'adiponectine est connue sous plusieurs noms du fait de sa découverte simultanée par quatre équipes différentes (Hu et al., 1996; Maeda et al., 1996; Nakano et al., 1996; Scherer et al., 1995). Aujourd'hui appelée APN, l'adiponectine est une protéine composée de 244 acides aminés (28 kDa) comprenant quatre domaines distincts. A l'extrémité N-terminale se situe une séquence signal de 18 acides aminés, spécifiques des protéines sécrétées. Elle est suivie

d'une séquence courte, hypervariable selon les espèces, qui comporte 23 acides aminés chez l'Homme. Un domaine collagène-like de 66 acides aminés précède un domaine globulaire de 137 acides aminés C1q-like, impliqué dans la liaison de l'adiponectine à son récepteur, situé à l'extrémité C-terminale (Hu et al., 1996). Selon cette structure, la protéine est dite de forme « **longue** ». Il est décrit également une seconde forme de l'adiponectine dite « **courte** » issue du clivage de la forme longue par une élastase (synthétisée par les monocytes et 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).

La polymérisation de l'adiponectine est un mécanisme essentiel pour la régulation de son activité biologique (Wang et al., 2008). Ainsi, cette protéine forme des trimères de faibles poids moléculaires (LMW) suite à la mise en place de liaisons hydrophobes entre les domaines globulaires et d'interactions non covalentes des domaines « collagène » (Shapiro and Scherer, 1998). De plus, les trimères d'adiponectine sont capables de former des hexamères, qui caractérisent alors la forme de poids moléculaire intermédiaire (MMW). Enfin, ces trimères peuvent former des structures encore plus complexes composées de 18 monomères ou plus qui constitue la forme de haut poids moléculaire (HMW) (Waki et al., 2003; Wedellova et al., 2013). Par ailleurs, la forme courte de l'adiponectine peut aussi former des structures trimériques (Wang et al., 2006). La polymérisation de l'adiponectine requière des modifications post-traductionnelles telles que l'établissement de ponts disulfures et/ou l'hydroxylation et la glycosylation de sites spécifiques, dont les résidus lysines (Lys⁶⁵, Lys⁶⁸, Lys⁷⁷ et Lys¹⁰¹) (Wang et al., 2008) (**Figure 14**).

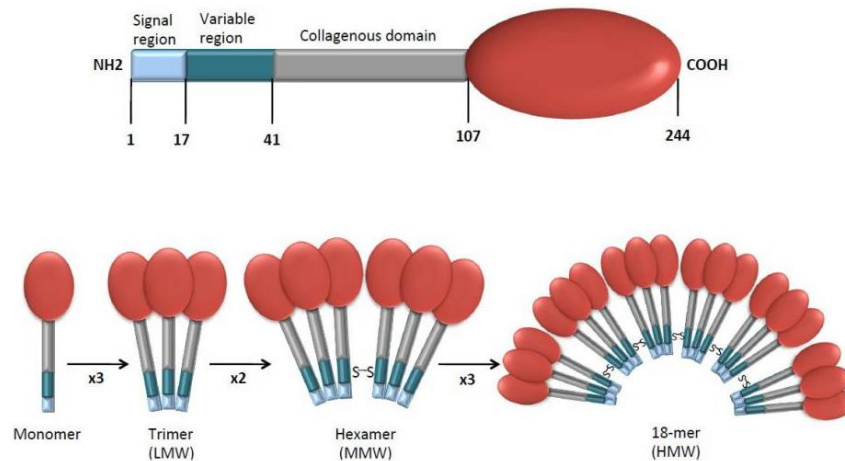


Figure 14 : Structures moléculaires de l'adiponectine (D'après Tumminia et al. 2019)

L'APN sous la forme monomérique est capable de former un trimère de faible poids moléculaire (LMW). Deux trimères peuvent ensuite s'associer pour former des hexamères de poids moléculaire moyen (MMW). Les trimères sont capables de former des complexes avec un poids moléculaire élevé (HMW).

b) Synthèse et régulation de l'expression de l'adiponectine

➤ La synthèse de l'adiponectine

L'adiponectine est une adipokine abondamment produite par le TA. Ses concentrations circulantes sont comprises entre 3 à 30 $\mu\text{g/ml}$, soit mille fois supérieure aux concentrations sériques de leptine. Elle représente ainsi 0,01% des protéines plasmatiques totales. Les formes MMW et HMW représentent 90 % de la protéine circulante et la forme LMW représente les 10 % restants. La forme globulaire est en revanche minoritaire dans la circulation générale. Les taux sériques de l'adiponectine sont régulés en fonction du statut nutritionnel et hormonal.

➤ La régulation nutritionnelle de l'expression de l'adiponectine

A la suite d'une restriction calorique, la synthèse et la sécrétion d'adiponectine par le TA est augmentée. De plus, les patients souffrant d'anorexie présentent une hyperadiponectinémie (Delporte et al., 2003). En revanche, suite à l'apport alimentaire, aucune variation des taux circulants d'adiponectine n'est observée (Imbeault et al., 2004; Rubin et al., 2008). Enfin, il a été montré que les concentrations sériques totales d'adiponectine et de sa forme HMW sont

inversement corrélées à l'IMC, aux taux circulants de glucose, d'insuline et de triglycérides, au degré d'insulino-résistance et surtout à l'accumulation de graisse viscérale (De Rosa A et al, 2013). Parallèlement, d'autres études ont mis en évidence que les taux circulants d'adiponectine totale et HMW sont augmentés après une perte de poids et/ou après une chirurgie bariatrique (Daniele et al., 2008; De Rosa et al., 2013; Kaser et al., 2008).

L'insuline, sécrétée après un apport alimentaire, semble jouer un rôle dans la modulation de l'expression du gène de l'adiponectine. Néanmoins, les données de la littérature sont encore controversées et ne permettent pas d'établir un lien précis entre l'insuline et les taux d'adiponectine. En effet, l'étude de Imagawa et al, montre que des patients atteints de diabète de type 1 (DT1) présentent des taux d'adiponectine plus élevés en comparaison avec les individus sains. Cependant dans la même étude, les patients souffrant du DT1 qui ont suivi une insulinothérapie durant deux années, n'ont pas présenté de variations de l'expression et de la sécrétion d'adiponectine (Imagawa et al., 2002). Par ailleurs, des patients souffrant de DT2, qui développent une insulino-résistance associée à une hyperinsulinémie, ont à l'inverse une hypoadiponectinémie, suggérant un effet négatif de l'insuline sur l'expression d'adiponectine (Basu et al., 2007).

➤ La régulation hormonale de l'expression de l'adiponectine

Plusieurs facteurs hormonaux et cytokiniques sont impliqués dans la modulation de l'expression et de la sécrétion de l'adiponectine.

Le rôle des **cytokines pro-inflammatoires** dans la modulation de l'expression de l'adiponectine a notamment été mis en évidence chez les individus obèses. En effet, l'excès de masse grasse est associé à une hypersécrétion des cytokines inflammatoires produites par le TA. De manière surprenante, chez les individus obèses, les taux sériques d'adiponectine sont effondrés suggérant que la sécrétion d'adiponectine est inversement proportionnelle à la masse grasse. Il a été démontré que le **TNF- α** joue un rôle majeur dans le contrôle négatif de l'expression de l'adiponectine. En se liant à ses récepteurs spécifiques, le TNF- α active la voie JNK ce qui conduit à une diminution de l'expression de facteurs de transcription favorisant

l'expression de l'adiponectine tels que PPAR γ , C/EBP α , *sterol regulatory element binding protein 1* (SREBP1) (Chang et al., 2014; Sewter et al., 2002; Wang et al., 2009). Les interleukines telles que l'**IL-6** et l'**IL-18** exercent également des effets inhibiteurs sur l'expression de l'adiponectine *via* l'activation de la voie ERK et une action négative sur le facteur de transcription *nuclear factor of activated T cells 4* (NFATc4) (Liu and Liu, 2010). Enfin, la *C-reactive protein* (**CRP**) semble également exercer des actions inhibitrices sur l'expression du gène de l'adiponectine, *via* les voies PI3K et JNK. Cependant, les mécanismes moléculaires sous-jacents ne sont pas clairement établis (Kaneko et al., 2011; Yuan et al., 2007).

Parmi les hormones, il a été décrit un effet inhibiteur des **androgènes**, pouvant ainsi expliquer le dimorphisme sexuel constaté dans la sécrétion d'adiponectine (Combs and Marliss, 2014; Daniele et al., 2008). En effet, une étude a mesuré les taux d'adiponectine circulants sur une cohorte d'hommes et de femmes sains. Cette étude révèle une différence significative entre les deux sexes, avec des taux moyens de 6 $\mu\text{g/ml}$ chez les hommes et 10 $\mu\text{g/ml}$ chez les femmes (Nishizawa et al., 2002). De plus, chez les hommes souffrant d'hypogonadisme, les taux d'adiponectine plasmatiques augmentent et sont restaurés par un traitement substitutif de testostérone (Lanfranco et al., 2004). Par ailleurs, chez la femme, aucune différence dans les taux circulants d'adiponectine n'est observée au cours du cycle ou après la ménopause. L'ensemble de ces données suggèrent que le dimorphisme sexuel observé pour l'adiponectine est spécifique des androgènes (Kleiblová et al., 2006; Nishizawa et al., 2002).

Le cortisol est également une hormone qui semble avoir un effet négatif sur la production d'adiponectine. En effet, les patients atteints du syndrome de Cushing (associé à un hypercorticisme chronique) présentent une diminution des taux d'adiponectine comparé aux individus sains (Fallo et al., 2004). De plus, chez la souris, l'administration d'un inhibiteur de la 11 β -HSD qui catalyse la transformation de la cortisone en cortisol, induit une augmentation de la production d'adiponectine.

Enfin, l'**hormone de croissance (GH)** exerce également des actions inhibitrices sur la production d'adiponectine. Des études *in vitro* ont montré que le traitement d'explants de tissus

adipeux humains par la GH diminue significativement l'expression de l'adiponectine. Ces résultats sont confirmés par des approches *in vivo*, utilisant un modèle de souris transgénique surexprimant la GH. Ces animaux présentent une hypoadiponectinémie par comparaison avec les souris sauvages. Les effets inhibiteurs de la GH sur l'expression de l'adiponectine semblent être médiés par l'activation de la voie PI3K (Nilsson et al., 2005).

c) Les récepteurs et voies de signalisation de l'adiponectine

➤ Les gènes ADIPOR1/ADIPOR2

L'adiponectine exerce ses effets physiologiques en se liant à ses récepteurs spécifiques, ADIPOR1 et ADIPOR2. Elle peut aussi se fixer dans une moindre mesure à la T-cadhérine.

ADIPOR1 est localisé sur le chromosome 1, sur le locus 1p36. Le promoteur du gène ADIPOR1 est situé en – 8131 pb et – 5530 pb en amont du site d'initiation de transcription et encadre l'exon 1 (Figure 15). Certains éléments de réponse ont été identifiés, tels que *insulin responsive element* (IRE), GRE mais aussi PPRE (Sun et al., 2006, 2008).

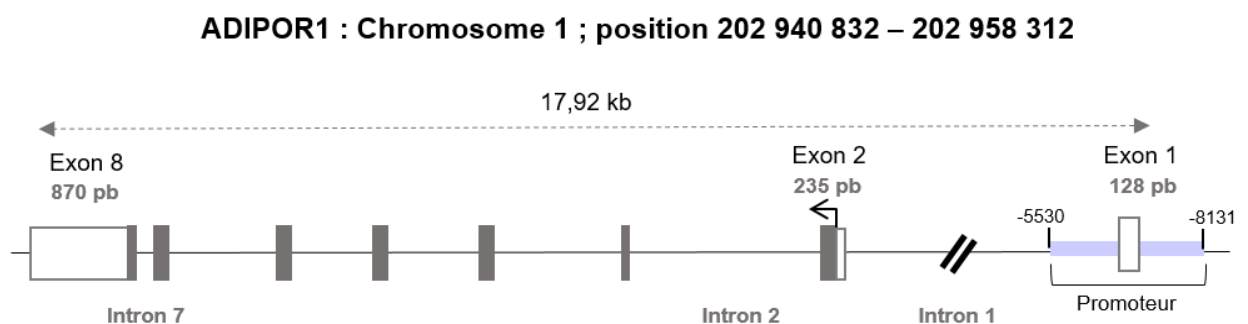


Figure 15 : Structure du gène du récepteur de l'adiponectine ADIPOR1

ADIPOR2 est présent sur le chromosome 12 en position 12p13. Le promoteur du gène ADIPOR2 est situé en - 64287 pb et - 60686 pb en amont du site d'initiation de transcription. Le promoteur du gène ADIPOR2 a été très peu caractérisé, néanmoins un élément de réponse GRE a été identifié (Sun et al., 2006) (Figure 16).

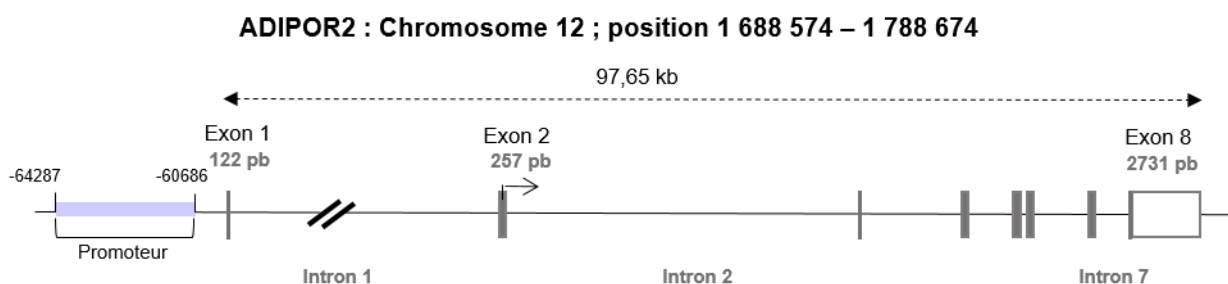


Figure 16 : Structure du gène du récepteur de l'adiponectine *ADIPOR2*

➤ Les protéines ADIPOR1/ADIPOR2

Le récepteur ADIPOR1 a été caractérisé en 2003 par l'équipe de Yamauchi (Yamauchi et al., 2003). Ces auteurs ont montré que ADIPOR1 est principalement exprimé dans le muscle squelettique. Dans cette étude, une autre séquence nucléotidique très similaire a également été mise en évidence, correspondant à la protéine ADIPOR2, dont l'expression est majoritairement hépatique, mais pas exclusivement. Plus récemment, les deux isoformes ont été identifiées dans de nombreux types cellulaires (macrophages, hypothalamus, adipocytes, cellules vasculaires...) (Yamauchi et al., 2014). Ces deux récepteurs présentent une forte homologie de séquence protéique (66,7 % de séquence commune). ADIPOR1 est une protéine de 42 kDa constituée de 375 acides aminés et ADIPOR2 est une protéine constituée de 386 acides aminés (43 kDa). Ces deux récepteurs sont des protéines à sept domaines transmembranaires avec une extrémité N-terminale localisée du côté intracellulaire et une extrémité C-terminale extracellulaire. ADIPOR1 possède une haute affinité pour l'adiponectine globulaire, mais il peut également se lier à l'adiponectine de forme longue et ADIPOR2 présente une affinité intermédiaire pour les formes globulaire et longue (Yamauchi et al., 2003).

➤ Les voies de signalisation de l'adiponectine

La liaison de l'adiponectine à son récepteur induit un changement de conformation de la protéine ADIPOR qui permet le recrutement de protéines adaptatrices. Ces protéines

adaptatrices sont très conservées entre les vertébrés et sont nommées *adaptor protein containing pleckstrin homology domain, phosphotyrosine binding domain and leucine zipper motif* (APPLs) (**Figure 17**). La voie de signalisation de l'adiponectine met en jeu deux protéines adaptatrices APPL1 et APPL2 qui présentent un niveau élevé d'homologie de séquence d'acides aminés (environ 54 %) et des domaines fonctionnels communs (Liu et al., 2017). APPL1 est activée par phosphorylation sur les résidus Ser⁴⁰¹ et Ser⁴³⁰. Les résidus serines sont particulièrement importants car ils permettent l'interconnexion entre les voies de l'insuline et de l'adiponectine (Gant-Branum et al., 2010).

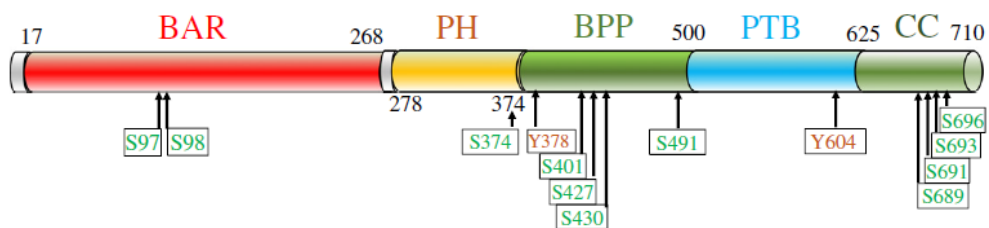


Figure 17 : Domaines fonctionnels et sites de phosphorylation d'APPL1 (D'après Liu et al. 2017)

La protéine adaptatrice APPL1 est recrutée après liaison de l'adiponectine à son récepteur et conduit à l'activation de diverses voies de signalisation. APPL1 est composée de sous-unités indispensables à son activation et aux interconnexions entre de nombreuses voies de signalisation. BAR : domaine Bin/amphiphysine/Rvs ; PH : domaine d'homologie de la pleckstrine ; BPP : région entre les domaines PH et PTB ; PTB : domaine de liaison à la phosphotyrosine.

Le recrutement des protéines APPL1/APPL2 conduit à l'activation de plusieurs voies de signalisation.

L'AMPK existe sous la forme d'un complexe trimérique composé d'une sous-unité **α catalytique** et de deux **sous-unités régulatrices** (les sous-unités **β** et **γ**). L'extrémité N-terminale de la sous-unité **α** est composée d'un domaine kinase, responsable de la phosphorylation de la thréonine Thr¹⁷² nécessaire l'activation complète de l'AMPK. L'extrémité C-terminale de la sous-unité **α** lie les sous-unités **β** et **γ**. La sous-unité **β** contient deux domaines conservés, dont un domaine de liaison au glycogène, qui permet à l'AMPK de détecter les taux de glycogène et un domaine C-terminal qui lie les sous-unités **α** et **γ**. La sous-

unité γ est composée de quatre sites pouvant potentiellement lier l'AMP, l'ADP ou l'ATP de manière compétitive (Garcia and Shaw, 2017; Xiao et al., 2011).

L'activation de l'AMPK par l'adiponectine est dépendante du calcium. Le flux intracellulaire de Ca^{2+} active une kinase dépendante du Ca^{2+} telle que la *calcium/calmodulin-dépendant kinase kinase 2* (CAMKK2), qui active l'AMPK par phosphorylation de la sous unité α sur le résidu Thr¹⁷². Une augmentation du ratio ADP/ATP intracellulaire conduit à une activation de la kinase *liver kinase-B1* (LKB1) qui elle-même active l'AMPK par phosphorylation de la sous unité α sur le résidu Thr¹⁷² (**Figure 18**).

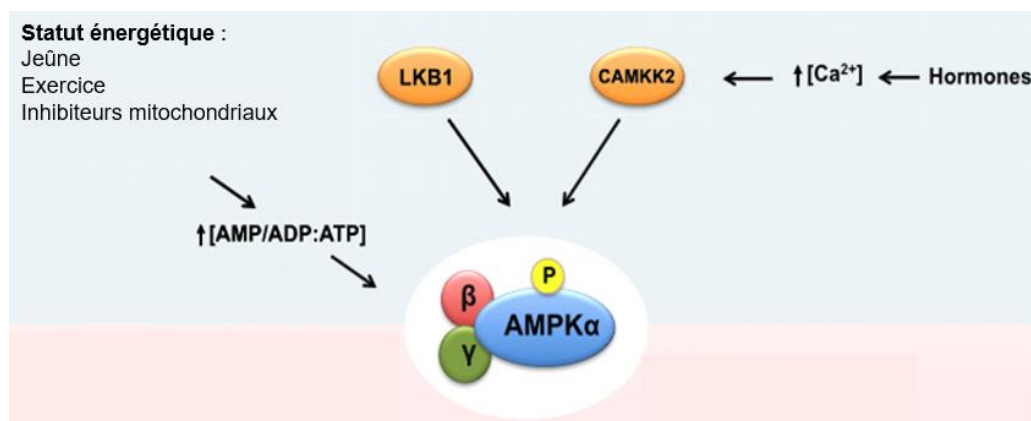


Figure 18 : Mécanismes d'activation de la voie de l'AMPK via ADIPOR (Modifié d'après Garcia and Shaw, 2017)

La protéine AMPK est activée par les variations de flux calcique intracellulaire par l'intermédiaire de la CAMKK2 et/ou par le ratio ADP/ATP favorisant la phosphorylation du résidu Thr¹⁷² de l'AMPK par la LKB1.

AMPK : 5'-AMP-Activated Protein Kinase ; CAMKK : calcium/calmodulin-dépendant kinase kinase 2 ; LKB1 : liver kinase-B1

L'adiponectine intervient également dans l'activation de la **voie p38-MAPK** (Mao et al., 2006; Ruan and Dong, 2016). En absence d'adiponectine, la protéine APPL1 forme un complexe inactif avec la protéine *transforming growth factor β -activated kinase 1* (TAK1). Suite à la liaison de l'adiponectine, le récepteur recrute alors APPL1, induisant la phosphorylation de la protéine TAK1, appartenant à la famille des *mitogen-activated protein kinase kinase* (Mkk). TAK1 favorise à son tour la phosphorylation de la Mkk-3. Mkk-3 stimule par la suite la p38-MAPK, conduisant à l'activation de nombreux facteurs de transcription contrôlant l'expression

de gènes impliqués dans la réaction inflammatoire, l'apoptose, la prolifération et différenciation cellulaire (Ono and Han, 2000; Xin et al., 2011) (**Figure 19**).

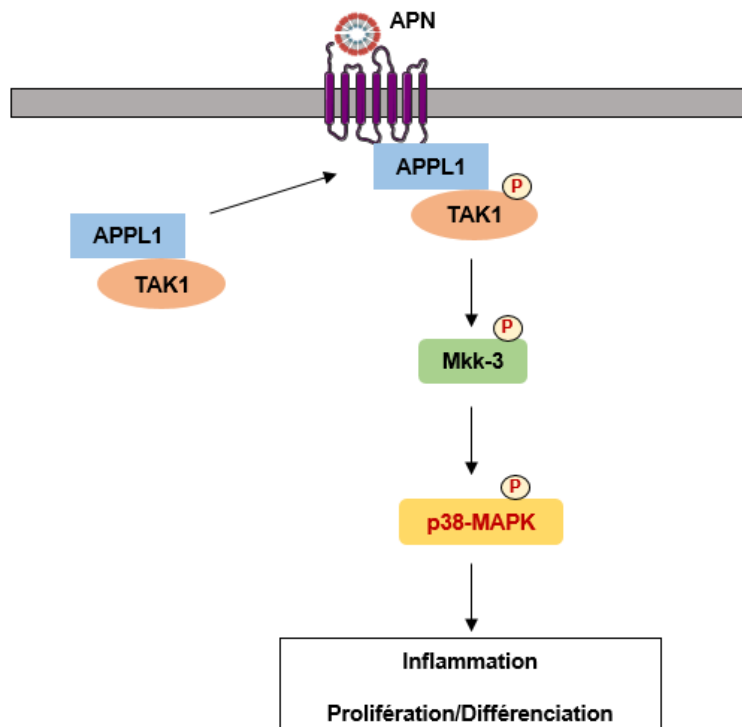


Figure 19 : Mécanismes d'activation de la voie MAPK via ADIPOR (D'après Xin et al. 2011; Ono et Han 2000)

La liaison de l'adiponectine permet le recrutement du complexe APPL1/TAK1. Une fois phosphorylée, la protéine TAK1 active la voie p38-MAPK par l'intermédiaire de la phosphorylation de Mkk-3.

APN : adiponectine ; Mkk : mitogen-activated protein kinase kinase ; TAK1 : transforming growth factor β -activated kinase 1

La **voie de l'AMPc-protéine kinase A** est également stimulée par l'adiponectine et impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire et l'homéostasie énergétique. Une fois l'adiponectine liée à son récepteur, la protéine APPL1 stimule l'activité de l'adénylate cyclase (AC). L'AMPc généré à la suite de la stimulation de l'AC active la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA). La PKA est un complexe symétrique de deux sous-unités régulatrices (R) et de deux sous-unités catalytiques (C). Elle est activée par la liaison de l'AMPc sur chacune des sous-unités R, ce qui provoque leur dissociation des sous-unités C (Taylor et al., 1992). La PKA module la transcription de gènes cibles, principalement par phosphorylation directe du facteur de transcription *cAMP response element-binding protein* (CREB). La phosphorylation est un

événement crucial car elle permet au facteur CREB d'interagir avec les co-activateurs *CREB-binding protein* (CBP) et p300 pour la liaison aux éléments de réponse à l'AMPc (CRE) (Mayr et al., 2001).

La PKA régule d'autres voies de signalisation. Par exemple, elle phosphoryle et inactive la PLC. En revanche, la PKA active la voie des MAPK en favorisant la phosphorylation et la dissociation d'une tyrosine phosphatase inhibitrice (PTP) (**Figure 20**).

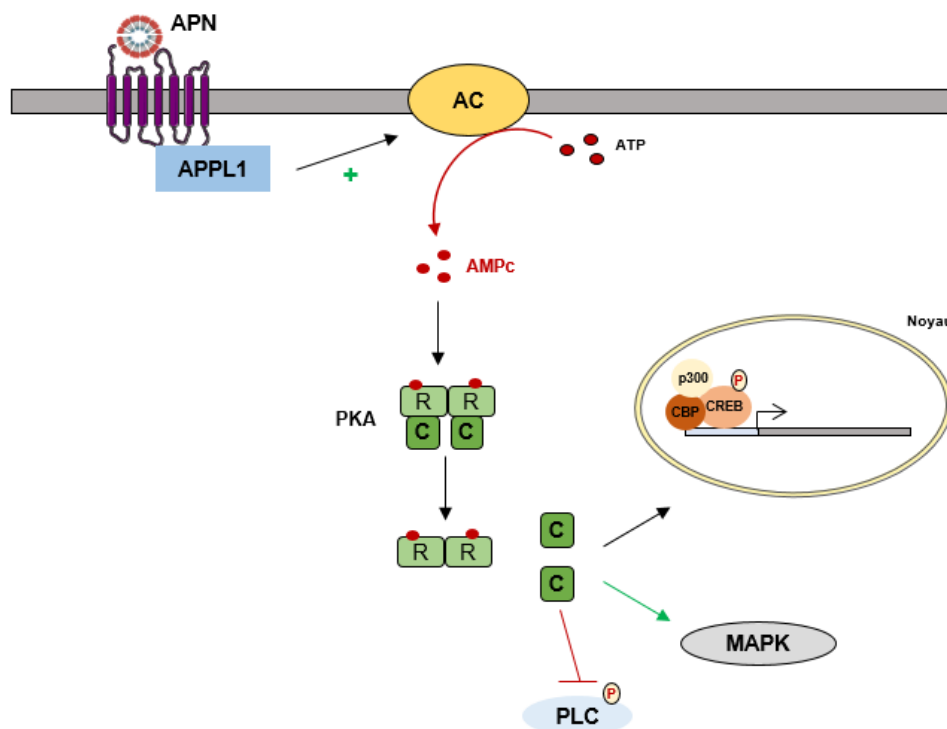


Figure 20 : Mécanismes d'activation de la voie PKA via ADIPOR (D'après Mayr, Canettieri, et Montminy 2001)

Après liaison à son récepteur, l'adiponectine active l'adénylate cyclase par l'intermédiaire d'APPL1, favorisant la conversion de l'ATP en AMPc. L'AMPc ainsi produit active la PKA.

AC : adénylate cyclase ; APN ; adiponectine ; CBP : CREB-binding protein ; CREB : cAMP response element-binding protein ; MAPK : mitogen activated protein kinase ; PKA : protéine kinase A ; PLC : phospholipase C

L'activation de la PI3K 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 (Ruan and Dong, 2016; Ryu et al., 2014). Les protéines IRS ainsi activées induisent la voie de la PI3K.

L'adiponectine active également la voie de la LKB1/AMPK, qui bloque les actions inhibitrices de la protéine p70-S6K sur la signalisation de l'insuline (Wang et al., 2007). Cette interconnexion entre les voies de l'adiponectine et de l'insuline permettent d'expliquer les actions insulino-sensibilisatrices de l'adiponectine (Combs et al., 2001; Yamauchi et al., 2001). Cependant, ces effets insulino-sensibilisateurs de l'adiponectine sont modulés par la formation du complexe APPL1 avec APPL2. En effet, en absence du signal adiponectine, APPL2 peut, soit se lier à l'extrémité N-terminale du récepteur de l'adiponectine, soit former un hétérodimère avec APPL1 et bloquer l'interaction APPL1/ADIPOR. Cependant, la liaison de l'adiponectine à son récepteur favorise la dissociation de ce complexe et la transmission du signal adiponectine dans la cellule (Ruan and Dong, 2016; Wang et al., 2009) (**Figure 21**).

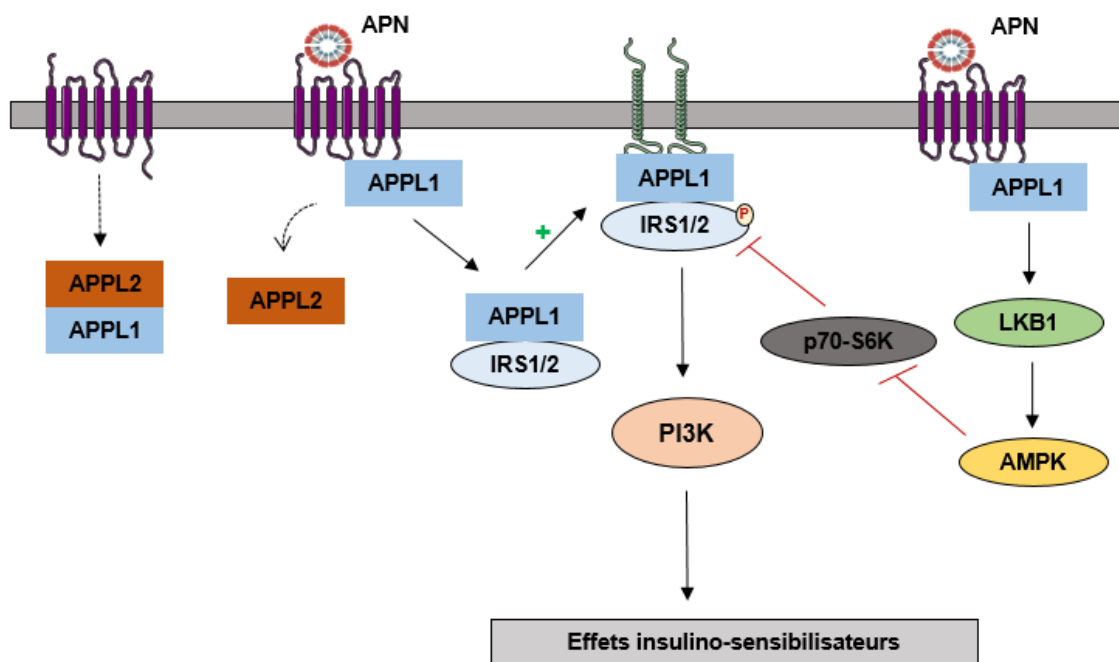


Figure 21 : Mécanismes d'actions des effets insulino-sensibilisateurs de l'adiponectine (D'après Ruan et Dong 2016)

Suite à la liaison de l'adiponectine, la protéine APPL1 recrutée favorise la liaison de IRS1/2 au récepteur de l'insuline, conduisant à l'activation de la voie PI3K. L'adiponectine active également la voie de la LKB1/AMPK, qui bloque les actions inhibitrices de la protéine p70-S6K sur la signalisation de l'insuline.

AMPK : 5'-AMP-Activated Protein Kinase ; IRS : insulin receptor substrate ; LKB1 : liver kinase-B1 ; PI3K : phosphoinositide 3-kinase

d) *Rôles physiologiques de l'adiponectine*

➤ Adiponectine et métabolisme énergétique

L'adiponectine exerce des rôles majeurs dans le métabolisme énergétique en agissant sur les organes essentiels de l'homéostasie énergétique c'est à dire le muscle squelettique, le TA et le foie.

En ciblant le foie, l'adiponectine de forme longue, active l'AMPK et réduit l'expression d'enzymes clés de la néoglucogenèse telles que la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) et la glucose-6-phosphatase (Combs et al., 2004; Nawrocki et al., 2006). Cette inhibition est médiée par une phosphorylation et une exclusion nucléaire du co-facteur *cAMP regulated transcriptional co-activator 2* (CRTC2) impliqués dans la transcription des gènes de la néoglucogenèse (Mihaylova and Shaw, 2011). Dans les cellules musculaires, l'adiponectine diminue la production de glycogène. En effet, suite à l'activation de l'AMPK par l'adiponectine, les isoformes de la glycogène synthase sont inhibées spécifiquement (Ceddia et al., 2005). Dans les cellules musculaires et les adipocytes, l'adiponectine, *via* la voie de l'AMPK, contrôle l'entrée du glucose en activant la translocation membranaire du transporteur GLUT4 (Mao et al., 2006). Cet effet est dû à la phosphorylation par l'AMPK du facteur *TBC domain family member 1* (TBC1D1) qui module la translocation du transporteur GLUT4 (Karbowska and Kochan, 2006). Ainsi, l'adiponectine possède une action **hypoglycémiante**.

Toujours dans le muscle et le foie, l'adiponectine module également le métabolisme des lipides. L'adiponectine active la β -oxydation en augmentant le transport mitochondrial des AG. L'entrée des acides gras dans la mitochondrie est contrôlée par la *carnitine-palmitoyl transferase-1* (CPT-1) (Karbowska and Kochan, 2006). L'adiponectine, *via* l'activation de l'AMPK, inhibe par phosphorylation directe les deux isoformes de l'acétyl-CoA carboxylase (ACC1 et ACC2), ce qui entraîne une réduction des concentrations de malonyl-CoA. Le malonyl-CoA est un inhibiteur de la CPT-1. L'adiponectine active donc la CPT-1 par une levée

d'inhibition et ainsi favorise la β -oxydation (Tomas et al., 2002).

De plus, l'adiponectine favorise l'accumulation des TG dans les adipocytes. En effet, sur des cultures de cellules 3T3-L1 surexprimant l'adiponectine, il a été mis en évidence que les adipocytes complètement différenciés accumulent un plus grand nombre de gouttelettes lipidiques et de taille supérieure par rapport aux cellules témoins. En effet, il a été montré que l'adiponectine, en activant la voie de l'AMPK, stimule l'activation du facteur de transcription SREBP1, qui est un facteur clé dans le contrôle du stockage des lipides (Li et al., 2011). L'adiponectine exerce par ce biais un rôle **hypolipémiant** (Fu et al., 2005).

Enfin, l'adiponectine contrôle la fonction mitochondriale, notamment par des actions sur la **biogenèse des mitochondries**. Dans les cellules musculaires, l'adiponectine stimule la biogénèse mitochondriale par l'activation de l'AMPK qui induit l'expression des facteurs de transcription *sirtuin 1* (SIRT1) et *PPAR γ coactivator 1-alpha* (PGC1- α) (Iwabu et al., 2010; Qiao et al., 2012). PGC1- α est considéré comme le régulateur clé de la biogénèse mitochondriale, en induisant l'expression des facteurs *estrogen-related receptor* (ERR) et *nuclear respiratory factor* (NRF) qui activent la transcription du génome mitochondrial (Jornayvaz and Shulman, 2010).

➤ Effets pro-apoptotiques

L'adiponectine est une hormone exerçant des effets pro-apoptotique dans de nombreux types cellulaires tels que les cellules endothéliales et musculaires. Cette hormone est capable de contrôler la balance entre l'expression des gènes anti-apoptotiques (*Bcl-2*) et pro-apoptotiques (*TP53* et *BAX*) (Bråkenhielm et al., 2004; Dieudonne et al., 2006).

Les principaux effets de l'adiponectine sont résumés dans la **figure 22**.

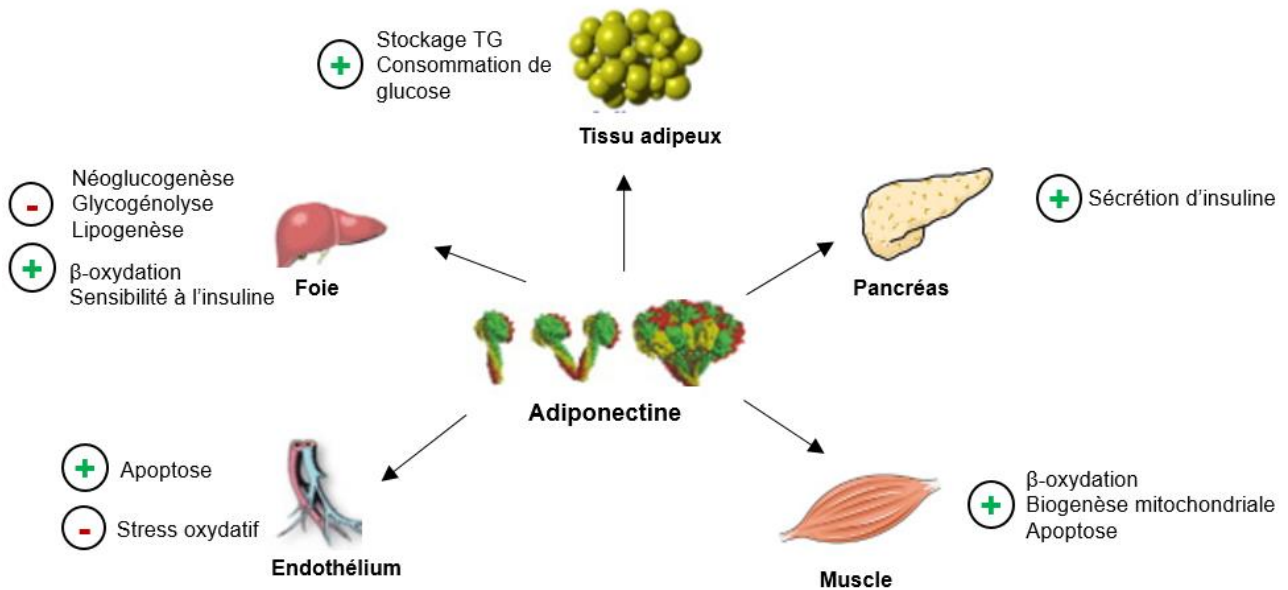


Figure 22 : Effets physiologiques de l'adiponectine (D'après Ye and Scherer. 2013)

Le rôle de l'adiponectine dans le contrôle de la fonction de reproduction chez la femme sera abordé dans le **chapitre 3**.

3. Les autres adipokines

➤ La résistine

La résistine est une adipokine appartenant à la famille des protéines riches en cystéines ou aux protéines dites *found in the inflammatory zone 3* (FIZZ3). Elle a été identifiée en 2001, pour son rôle dans le métabolisme du glucose *via* son implication dans la **résistance à l'insuline**. Localisé sur le chromosome 19, le gène *RETN* de la résistine code une protéine de 12,5 kDa, avec une séquence mature finale de 108 acides aminés, chez l'Homme. La protéine circule sous la forme de protéines dimériques constituée de deux polypeptides de 92 acides aminés liés par un pont disulfure et formant des complexes de haut et faible poids moléculaires (Gerber et al., 2005) (**Figure 23**).

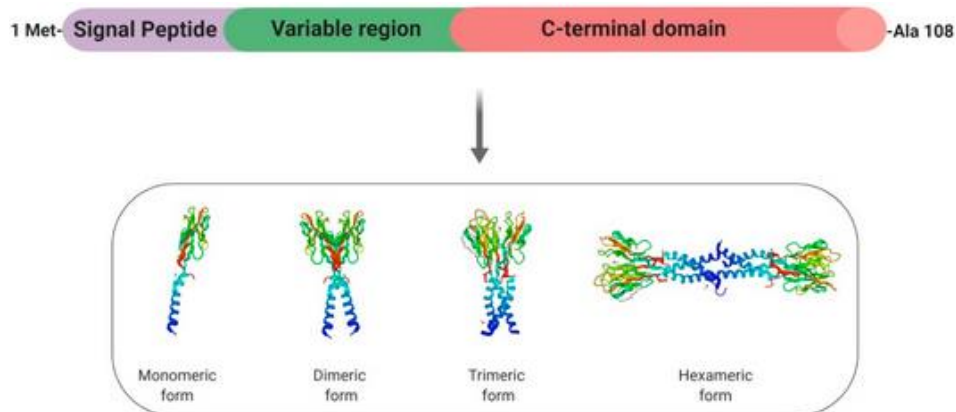


Figure 23 : Structure et complexes protéiques formés par la résistine (D'après Estienne et al. 2019)

La résistine est produite par les préadipocytes et les adipocytes humains. Cependant, chez l'Homme, la résistine est principalement produite par les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC), les macrophages et les cellules de la moelle osseuse (Degawa-Yamauchi et al., 2003; Fain et al., 2003; Patel et al., 2004). Les mécanismes d'action de la résistine ne sont pas clairement décrits à ce jour. Néanmoins, il a été montré dans un modèle murin, que la résistine exercerait des effets **insulino-résistants**. En effet, après fixation au récepteur *Toll-like receptor* (TLR4) et à l'induction des voies PI3K, ERK et JNK, la résistine induit le blocage de la voie de signalisation de l'insuline (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'acétyl-coA carboxylase *via* le facteur transcriptionnel *carbohydrate-responsive element-binding protein* (ChREBP) (Ikeda et al., 2013). Enfin, la résistine favorise également la néoglucogenèse hépatique après sa fixation au récepteur TLR4 (Banerjee and Lazar, 2001) et l'**adipogenèse**, en liant le *receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1* (ROR1) et en activant la voie MAPK (Sánchez-Solana et al., 2012). Il a également été montré des effets **pro-inflammatoires** de la résistine. En effet, après liaison de cette adipokine au récepteur *cyclase associated protein 1* (CAP1) situé à la surface des macrophages, elle active les voies PKA et NF- κ B, favorisant ainsi la production de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-6 et TNF- α (Lee et al., 2014; Silswal et al., 2005). Il a été montré que, chez les patients obèses et diabétiques, la concentration sérique de résistine

est significativement augmentée (Gerber et al., 2005; Stepan et al., 2001).

➤ La chémérine

La chémérine a été identifiée en 2003 comme le produit du gène *RARRES2* (récepteur de l'acide rétinoïque 2) situé sur le chromosome 7 chez l'Homme. Ce gène code pour une protéine de 163 acides aminés (16 kDa) sécrétée sous une forme inactive, la **pro-chémérine**. Le clivage du peptide signal à l'extrémité C-terminale par des sérines protéases inflammatoires entraîne la libération d'un précurseur inactif (chimérine-163S) dans le milieu extracellulaire (Zabel et al., 2008). Par la suite, le précurseur nécessite des clivages C-terminaux extracellulaires supplémentaires sur divers sites pour générer des chimérines actives (**Figure 24**).

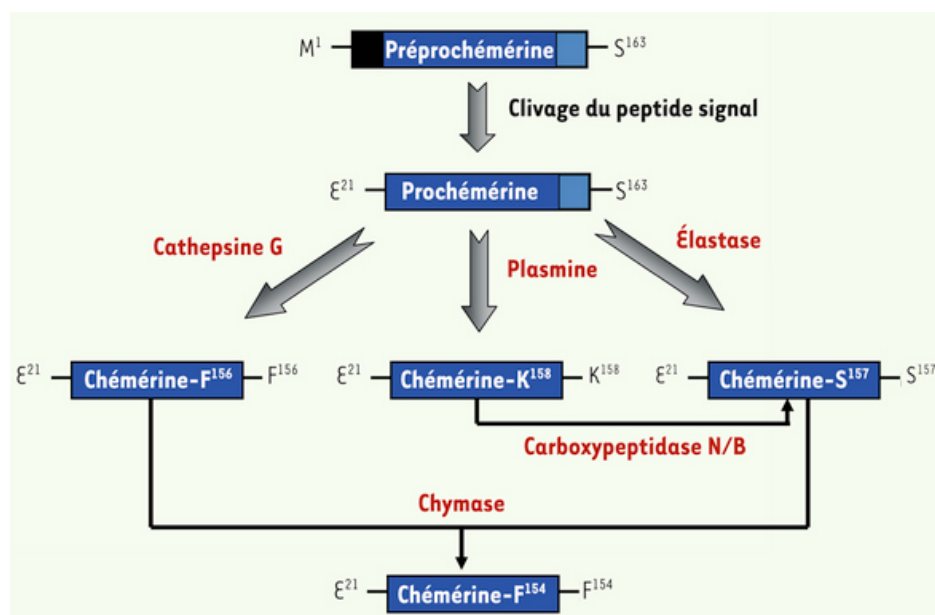


Figure 24 : Modifications post-traductionnelles de la chémérine (D'après Estienne et al. 2019)

Chez l'Homme, cette hormone est exprimée abondamment dans le tissu adipeux blanc, le foie, le placenta et dans une moindre mesure, dans le tissu adipeux brun, les poumons, les muscles squelettiques, les reins, les ovaires et le cœur (Estienne et al., 2019; Rourke et al., 2013). Le premier récepteur de la chémérine identifié est la *chemokine like receptor 1* (CMKLR1) (Gantz et al., 1996). La chémérine se lie également aux récepteurs *G protein receptor 1* (GPR1) et *C chemokine receptor-like 2* (CCRL2) (Barnea et al., 2008; Zabel et al., 2008). Ces trois

récepteurs sont des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). La chémérine et son récepteur CMKLR1 jouent un rôle important dans l'**homéostasie glucido-lipidique**. *In vitro*, dans des préadipocytes et des adipocytes matures de la lignée murine 3T3-L1, l'inactivation du gène codant la chémérine ou son récepteur CMKLR1 réduit l'expression de gènes tels que GLUT4 et celui codant la lipase hormono-sensible (Goralski et al., 2007). En outre, chez l'Homme et la souris, le promoteur du gène de la chémérine contient des sites de liaison pour les facteurs de transcription PPAR γ et la famille SREBP, suggérant un rôle de la chémérine dans le contrôle de l'**adipogenèse** (Muruganandan et al., 2011; Zabel et al., 2014).

Chez l'Homme et chez les rongeurs, plusieurs études montrent une corrélation positive entre les taux plasmatiques de chémérine, l'obésité et le syndrome métabolique (Bozaoglu et al., 2007; Weigert et al., 2010). *In vitro*, la synthèse de chémérine par les adipocytes humains et murins est induite par les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β et le TNF- α (Kralisch et al., 2009). De plus, des explants de TA de patients obèses sécrètent plus de chémérine que des explants de patients non obèses (Sell et al., 2009).

➤ La visfatine

La visfatine ou *nicotinamide phosphoribosyltransferase* (NAMPT) a été clonée en 1994 à partir d'une banque d'ADNc de lymphocytes du sang périphérique humain et appelée *pre-B-cell colony enhancing factor* (PBEF) (Samal et al., 1994). Cette hormone est codée par le gène PBEF1 localisé sur le chromosome 7 et code une protéine de 491 acides aminés (53 kDa). La visfatine est principalement exprimée dans la moelle osseuse, le foie et les muscles chez l'Homme. Elle existe sous deux formes, les formes intra et extracellulaire (iNAMPT et eNAMPT, respectivement) (Revollo et al., 2007). Le récepteur de la visfatine est encore inconnu. Cependant, le récepteur de l'insuline semble être un bon « candidat ». En effet, la visfatine est capable d'induire la phosphorylation de IRS-1/2 et l'activation des voies PI3K et MAPK (Fukuhara et al., 2005). La visfatine exerce donc des actions **insulino-sensibilisatrices** dans l'organisme, en mimant les effets de l'insuline. D'autre part, cette adipokine est décrite également comme une hormone **pro-inflammatoire et athérogène**. Elle

favorise la libération des cytokines inflammatoires TNF- α , de l'IL-6 et IL-1 β par l'activation de la voie NF- κ B dans les monocytes (Moschen et al., 2007). Elle exerce également des effets **prolifératifs et anti-apoptotiques** via l'activation de la voie des MAPK (Bi and Che, 2010). Enfin, la visfatine agit également en tant qu'enzyme impliquée dans la biosynthèse du NAD, chez la souris (Revollo et al., 2007). Chez l'Homme, les concentrations plasmatiques de visfatine sont positivement corrélées à l'IMC (Berndt et al., 2005).

➤ L'apéline

L'apéline a été identifiée en 1998 par une équipe japonaise (Tatemoto et al., 1998). Le gène de l'apéline humaine (APLN) se trouve sur le chromosome X (Lee et al., 2000). L'apéline est largement exprimée dans divers types de tissus et d'organes tels que le système nerveux central, l'hypothalamus, le tissu adipeux, le muscle squelettique, le système digestif et les ovaires (Boucher et al., 2005; Huang et al., 2019; Medhurst et al., 2003; Roche et al., 2016). L'apéline humaine existe sous la forme de **préproapéline** (77 acides aminés) qui sera clivée en **proapéline** (55 acides aminés) puis en formes actives **apéline-36**, **-17**, **-13**. Il existe également une isoforme pyroglutaminée de l'apéline-13 (Pyr-Apéline-13) (Tatemoto et al., 1998) (**Figure 25**).

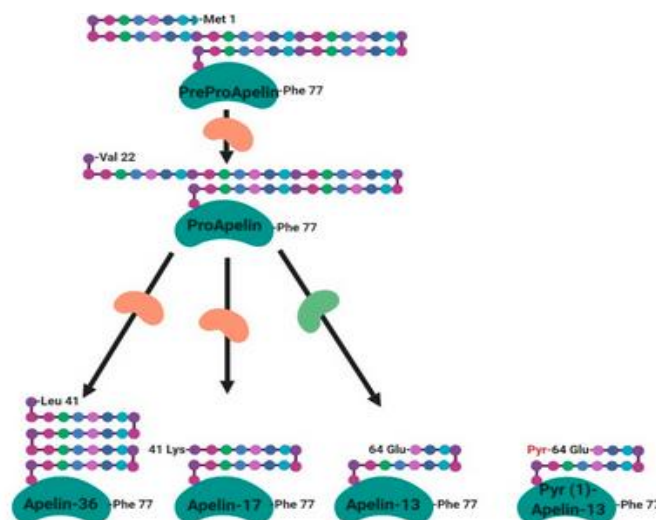


Figure 25 : Modifications post-traductionnelles de l'apéline (D'après Estienne et al. 2019)

Le récepteur de l'apéline (APJ) a été identifié pour la première fois en 1993. Il s'agit d'un récepteur couplé aux protéines G (GPCR) (O'Dowd et al., 1993). L'apéline est capable d'activer un grand nombre de voies de signalisation, selon la forme active considérée. Par exemple, l'apéline-13 et l'apéline-36 activent la phosphorylation de ERK1/2 dans des cellules d'ovaire de hamster chinois (Masri et al., 2015). De plus, l'apéline favorise la **prolifération cellulaire** *via* l'activation des voies ERK1/2, mTOR et des cascades intracellulaires dépendantes de Akt. Par ailleurs, cette hormone semble jouer un rôle prépondérant dans **l'homéostasie glucido-lipidique**. En effet, l'équipe de Boucher et al., a montré que l'administration d'insuline à des souris obèses augmente l'expression du gène de l'apéline *via* l'activation des voies PI3K/Akt, PKC, and MAPK (Boucher et al., 2005). Des études réalisées *in vitro* sur les cellules β pancréatiques humaines et murines montrent que l'apéline, en fonction de la dose utilisée, est capable d'augmenter ou de diminuer la sécrétion d'insuline (Guo et al., 2009; Ringström et al., 2010). Le rôle de l'apéline dans l'homéostasie glucidique a été également confirmé par le phénotype des souris déficientes pour l'apéline, dont la perte de la sensibilité à l'insuline est exacerbée lorsqu'elles sont soumises à un régime riche en graisses et en sucre (Yue et al., 2010). De plus, ces souris présentent une adiposité abdominale et des taux circulants d'acides gras plus importants que les souris témoins. Chez les individus obèses et/ou insulino-résistants, la concentration sérique d'apéline est plus élevée (Boucher et al., 2005).

II. L'obésité : généralités

A. Définition de l'obésité

L'obésité se définit par une accumulation excessive de masse grasse corporelle pouvant entraîner une augmentation excessive de poids supérieure à 25 % du poids normal estimé et engendrer des troubles de la santé. Elle est due, le plus souvent, à une alimentation trop riche et une activité physique faible. D'autres facteurs génétiques, psychologiques,

environnementaux et les maladies chroniques peuvent intervenir dans la survenue de l'obésité. L'obésité se mesure par un indice de référence international, l'IMC, égal au rapport poids (kg) sur le carré de la taille (m). Un IMC inférieur à 18,5 kg/m², signifie que l'individu présente une insuffisance pondérale. Un individu de corpulence normale présente un IMC compris entre 18,5 et 25 kg/m². Un IMC compris entre 25 et 30 kg/m² indique un **surpoids**. L'obésité se définit par un IMC ≥ 30 kg/m². On distingue deux types d'obésité. D'une part, l'obésité **androïde** (abdominale ou viscérale) qui est caractérisée par un excès de masses grasses localisées dans la partie haute du corps, en particulier au niveau de l'abdomen. D'autre part, l'obésité **gynoïde** (périphérique ou sous-cutanée) qui se caractérise par des dépôts graisseux dans les parties basses du corps (hanches et cuisses).

B. Epidémiologie

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'obésité cause 2,8 millions de décès/an dans le monde. En 2016, plus de 1,9 milliard d'adultes âgés de 18 ans et plus étaient en surpoids (39 %) et plus de 650 millions d'adultes étaient obèses (13 %) **dans le monde**. La prévalence mondiale de l'obésité a presque triplé entre 1975 et 2016. Si certains pensent que les pays les plus riches et les plus développés du monde sont les plus obèses, ce n'est pas toujours le cas. Par exemple, les États-Unis et le Royaume-Uni ne sont classés que 12^{ème} et 36^{ème}, respectivement, par rapport aux autres nations. Plusieurs pays dotés de petites économies ont été classés comme les plus obèses. Par exemple, dans le pays de Nauru (île d'Océanie) 61 % de sa population a un IMC supérieur à 30 (<http://worldpopulationreview.com>). L'augmentation de la fréquence de l'obésité a été observée dès les années 1990 dans la **population américaine**. Une enquête réalisée entre 1991 et 1998 sur un groupe d'individus de plus de 18 ans, a montré que la prévalence de l'obésité est passée de 11,7% chez les hommes (12,2% chez les femmes) à 17,7% (18,1% chez les femmes) (Mokdad et al., 1999). Aujourd'hui, les chiffres sont alarmants pour la population américaine. Une étude a montré que près de 40% des américains de plus de 20 ans étaient obèses en 2016 contre 34% en 2007

(Hales et al., 2018). L'enquête menée par ObEpi en 1997, 2000 et 2003 a montré que la prévalence de **l'obésité en France** a augmenté de 8,2 à 11,3 % sur cette période. Cette augmentation s'observe pour tous les groupes d'âge, mais elle est plus élevée chez les 25-34 ans et les 35-44 ans (de l'ordre de 8 % par an). Plus récemment, l'enquête d'ObEpi-Roche de 2012 sur la population française révèle que l'obésité concerne aujourd'hui 15 % des adultes, contre seulement 6,1% en 1980. De plus, entre 11 et 16 % des femmes en âge de procréer sont obèses.

D. Les causes

La prédisposition à l'obésité dépend de **plusieurs gènes** tels que *melanocortin 4 receptor (MC4R)*, *proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 (PCSK1)*, *pro-opiomelanocortin (POMC)* et *brain-derived neurotrophic factor (BDNF)* (Choquet and Meyre, 2011). Néanmoins, on considère trop souvent cette composante génétique comme la cause principale dans l'étiologie de l'obésité. En effet, une étude menée sur des jumeaux a montré que l'activité physique prévenait l'obésité quel que soit le degré de prédisposition génétique (Samaras et al., 1999).

Cependant, l'obésité résulte principalement d'un **déséquilibre de la balance énergétique**, de façon répétée et à long terme (Hill et al., 2012; Malik et al., 2013). L'activité physique permet une dépense énergétique indispensable au maintien de la balance énergétique. Elle représente en moyenne 30 % de la dépense quotidienne chez un individu « moyen ». Les études épidémiologiques ont également décrit le rôle clé de l'activité physique dans **la prévention** de la prise de poids. Ainsi, les individus actifs présentent moins de risque de développer une obésité que les individus sédentaires (Williamson et al., 1993). Par ailleurs, l'équilibre de la balance énergétique dépend d'autres facteurs tels que, i) la dépense de repos, qui représente 60 % de la dépense énergétique quotidienne liée aux fonctions vitales et ii) la thermogénèse postprandiale qui représente 10 % de la dépense énergétique quotidienne. Cette dépense est caractérisée par la digestion, le transport et le stockage des nutriments.

Les changements environnementaux et sociétaux, observés au cours de ces dernières années, ont modifiés nos habitudes en matière d'alimentation et d'exercice physique et sont à l'origine de l'augmentation de la prévalence de l'obésité (Malik et al., 2013).

Ainsi, accéder à une meilleure compréhension des causes et des mécanismes biologiques conduisant à l'obésité est aujourd'hui un des enjeux majeurs de la recherche. De plus, comme toutes les maladies chroniques, une fois « établie » l'obésité est quasiment irréversible. La prévention de son développement est donc primordiale pour tenter d'enrayer l'épidémie mondiale.

E. Les complications

L'obésité est une maladie chronique dont les effets se manifestent environ après 10 ans d'excès de poids (en particulier chez les individus atteints d'obésité sévère). De nombreuses études ont mis en évidence une étroite corrélation entre une valeur d'IMC élevée et des pathologies associées à une mortalité accrue (Berrington de Gonzalez et al., 2010). Plus précisément, l'obésité dite « abdominale ou viscérale » est un facteur de risque de maladies métaboliques telles que les maladies cardiovasculaires, les maladies hépatiques, le diabète de type 2 (DT2), l'athérosclérose et de certains cancers (Guh et al., 2009; Mokdad et al., 2003). Ces pathologies sont couramment appelées « comorbidités » associées à l'obésité.

Il a été proposé de regrouper, dans une entité unique appelée **syndrome métabolique**, la présence des anomalies glucido-lipidiques associées à l'insulino-résistance, l'hypertriglycéridémie (HDL-cholestérol bas et hyperglycémie), l'hypertension artérielle et l'obésité abdominale.

Plus récemment, il a été démontré que l'obésité est caractérisée par une **inflammation chronique de bas grade** systémique qui représente un facteur clé dans le développement de l'ensemble de ces comorbidités (Monteiro and Azevedo, 2010; Rodríguez-Hernández et al., 2013).

III. Obésité : statut inflammatoire

A. Généralités

Les cellules immunitaires sont généralement classées en deux grands lignages : Le lignage **myéloïde**, comprend les macrophages, les cellules dendritiques (DC), les mastocytes et les granulocytes (neutrophiles, éosinophiles et basophiles). Le lignage **lymphoïde** comprend les lymphocytes T (LT) et lymphocytes B (LB), les natural killer (NK) (Fang et al., 2018; Lim et al., 2013). Les cellules myéloïdes sont considérées comme les acteurs majeurs de l'immunité innée et les cellules lymphoïdes sont impliquées dans l'immunité acquise ou adaptative. Dans la lignée lymphoïde, la majorité des lymphocytes T (LT) dits « helper » expriment le marqueur CD4⁺ mais possèdent des profils de sécrétion de cytokines distincts. Les LT sont donc divisés en différents sous-types. Les Th1 sécrètent l'IFN- γ , les Th2 produisent l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13, les Th17 se caractérisent par la sécrétion de l'IL-17, l'IL-21 et l'IL-22 et enfin les T régulateurs (Treg) sécrètent l'IL-10 et le TGF- β (Oestreich and Weinmann, 2012). On distingue également les LT-CD8⁺ dits « cytotoxiques », qui produisent une grande variété de substances cytotoxiques telles que les perforines et les granzymes. Les LT-CD8⁺ sécrètent également des cytokines qui régulent l'activation d'autres cellules immunitaires (Fang et al., 2018). Dans la lignée myéloïde, les macrophages sont divisés en deux sous-populations : les macrophages **M1**, qui sont activés par des cytokines pro-inflammatoires tels que le facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF), l'IFN- γ et les liposaccharides (LPS) bactériens. L'activation des macrophages de type **M2** se produit sous l'influence de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-4, l'IL-13, l'IL-10 et le facteur stimulant de colonies (M-CSF). Les DC sont des cellules présentatrices d'antigènes qui jouent un rôle majeur dans la transition de l'immunité innée à l'immunité adaptative (Mellman, 2013). Les neutrophiles sont les premiers types cellulaires recrutés sur le site inflammatoire et sont donc considérés comme les cellules effectrices en cas d'inflammation aiguë. En effet, ces cellules contiennent dans leur cytoplasme un large nombre de granules contenant diverses substances telles que les

lysozymes, la neutrophile élastase et la myéloperoxydase qui participent à la phagocytose et ainsi à l'activité anti-microbienne. De plus, les neutrophiles sont capables de sécréter une large quantité de chémokines telles que la *chemokine C-C motif ligand 3* (CCL3) et de cytokines telles que le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-8 ce qui permet le recrutement et l'activation d'une seconde vague de cellules immunitaires dont les macrophages, les DC et les lymphocytes (Amulic et al., 2012; Mantovani et al., 2011). Les éosinophiles sont, contrairement aux neutrophiles, impliqués dans la réponse anti-inflammatoire. Ils sécrètent un ensemble de cytokines tel que l'IL-4, IL-10, IL-13 et TGF- β participant au recrutement et à la différenciation des lymphocytes T en Th2 et des macrophages en sous-type M2 (Spencer and Weller, 2010) (**Figure 26**).

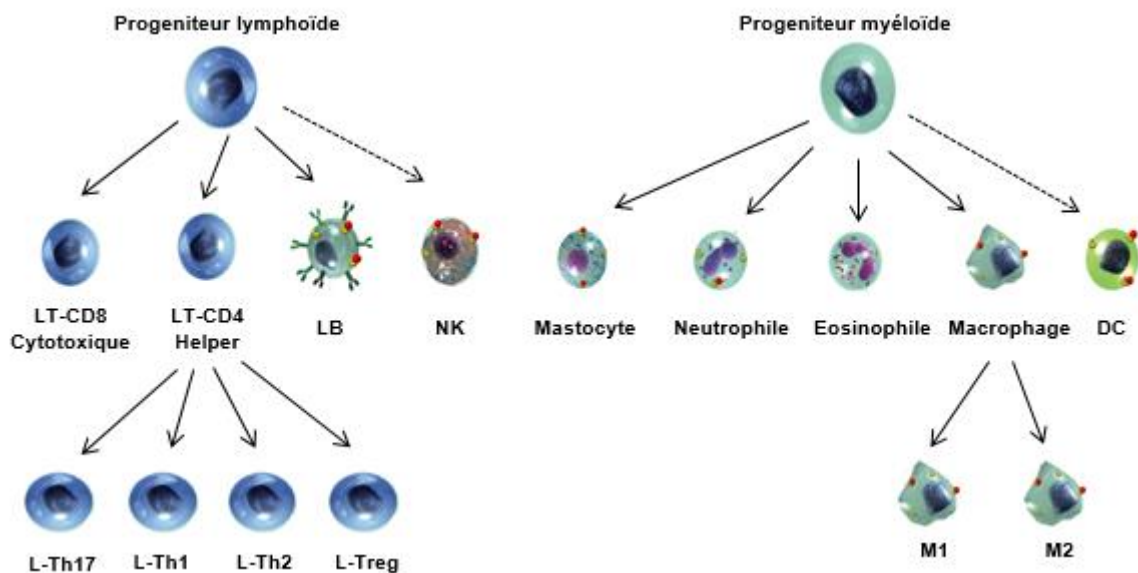


Figure 26 : Différenciation des lignages immunitaires

B. Inflammation du tissu adipeux

Au cours de l'obésité, l'hypertrophie excessive des adipocytes crée un risque accru de rupture de l'intégrité des adipocytes. En effet, leur capacité de stockage n'étant pas illimitée, une fois la limite d'expansion atteinte, on observe une hypoxie et une nécrose des adipocytes (Rosenow et al., 2013). Il en résulte une altération du TA avec des changements dans le statut hormonal, métabolique et la survenue d'une inflammation (Hursting and Hursting, 2012). En effet,

l'obésité est très étroitement associée à un type d'inflammation légèrement différente de celle observée en réponse à un pathogène, elle est nommée inflammation chronique de bas grade ou **métabolique** (inflammation des tissus métaboliques). Le signal « déclencheur » pourrait être l'hypoxie des adipocytes, qui semble être un lien clé entre les dommages cellulaires initiaux et l'activation des processus inflammatoires. En effet, l'état hypoxique conduit à l'activation du facteur de transcription *hypoxia inducible factor-1* (HIF-1). Il en résulte plusieurs effets négatifs dans le tissu adipeux dont i) la production de radicaux libres ii) une altération de la libération des cytokines et iii) une résistance à l'insuline. Ainsi, la métabolique est caractérisée par une augmentation des cytokines pro-inflammatoires circulantes (TNF- α , l'IL-6, IL-1 et leptine) et une diminution des cytokines anti-inflammatoires (adiponectine, IL-4, IL-13) (Howe et al., 2013; Pucino et al., 2014). Par ailleurs, l'excès d'accumulation de masse grasse est également associé à des changements substantiels dans la quantité et la fonction des cellules immunitaires. Cet état inflammatoire entraîne l'augmentation du nombre de macrophages, de mastocytes, de neutrophiles et de lymphocytes T et B et inversement une réduction des autres populations cellulaires tels que les éosinophiles et les lymphocytes Th2 ou Treg dans le TA (Cildir et al., 2013). De plus, les cellules immunitaires nouvellement recrutées doivent également traverser la barrière endothéliale pour pénétrer dans le tissu adipeux. Ainsi, pendant les premières phases de l'obésité, les processus inflammatoires, mais aussi l'hypoxie, peuvent jouer un rôle important dans le maintien d'une angiogenèse adéquate et des fonctions adipocytaires. Plus précisément, l'hypoxie au début de l'expansion du TA, induit l'angiogenèse *via* la régulation positive d'un ensemble de gènes comprenant le VEGF. Cependant, la persistance de l'obésité se traduit par une hypoxie sévère, qui ne parvient plus à induire le VEGF, entraînant une altération de l'angiogenèse et l'apparition d'une fibrose excessive du TA (Crewe et al., 2017) (**Figure 27**).

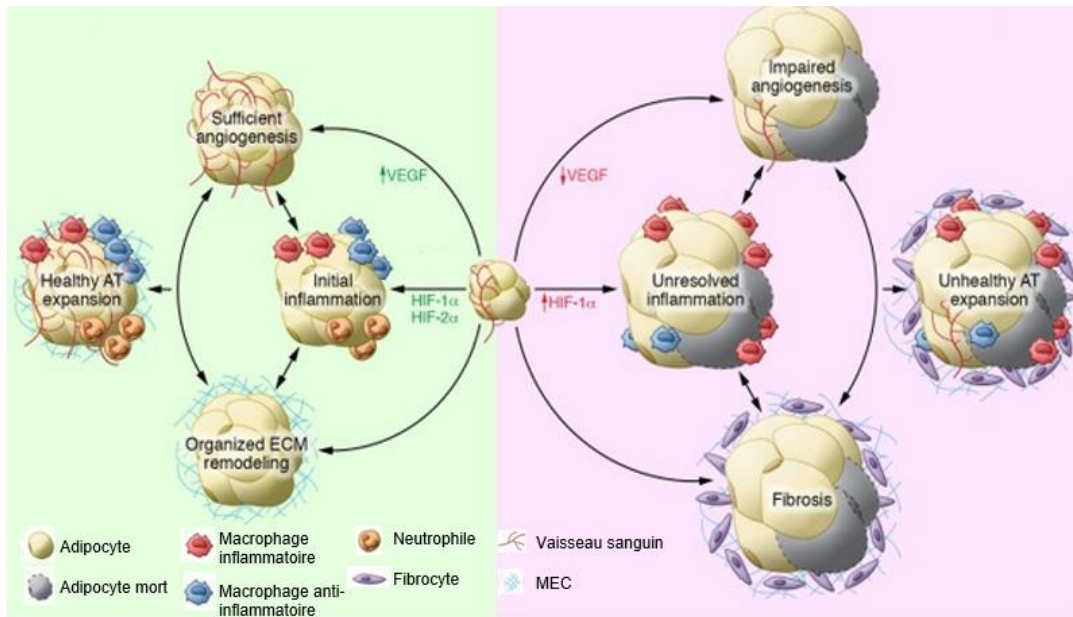


Figure 27 : Représentation de l'expansion physiologique et anormale du TA (Modifié d'après Crewe et al. 2017)

AT : adipose tissue ; HIF : hypoxia inducible factor ; MEC : matrice extra-cellulaire ; VEGF : vascular endothelial growth factor

1. Obésité et profil immunitaire du tissu adipeux

➤ Les neutrophiles

Le rôle des neutrophiles dans l'initiation de l'inflammation liée à l'obésité est bien décrit dans la littérature. En effet chez l'Homme, il a été démontré que les concentrations plasmatiques de myéloperoxydase, de calprotectin (facteur produit majoritairement par les neutrophiles) et de CD66b (un marqueur d'activation des neutrophiles) sont augmentées chez des individus obèses (Nijhuis et al., 2009). Chez la souris, une alimentation riche en graisses multiplie par vingt l'infiltration des neutrophiles dans le TA. Cette infiltration excessive débute après trois jours de nutrition riche en graisses alors que l'infiltration des macrophages est observée après sept jours (Nguyen et al., 2007). Une autre étude montre également qu'une alimentation riche en graisses augmente rapidement les marqueurs des neutrophiles (CD11b, Ly6g, F4/80 et CD11c) dans le TA murin (Talukdar et al., 2012). L'augmentation de la sécrétion d'IL-8 par les adipocytes hypertrophiques semble être le signal de recrutement des neutrophiles. Les

neutrophiles sécrètent eux-mêmes des cytokines et des chémokines qui faciliteront l'attraction et l'infiltration des macrophages (Talukdar et al., 2012).

➤ Les lymphocytes T

Dans le TA, les LT constituent la deuxième population immunitaire la plus abondante après les macrophages. L'obésité, en plus d'augmenter leur nombre, est également associée à une dérégulation de la proportion des différents sous-types présents dans le TA. En effet, l'obésité favorise la différenciation des LT vers le sous-type **Th1**. Cependant leur rôle dans la mise en place de l'état inflammatoire du TA reste mal compris. De manière générale, les Th1 *via* la sécrétion de l'IFN- γ , favorise l'infiltration des macrophages M1. Il a été montré que des souris obèses déficientes en IFN- γ présentent une inflammation réduite du TA et une amélioration de la sensibilité à l'insuline, sans changement de poids (Rocha et al., 2008). Cependant, l'équipe de Winer et al, a mis en évidence, sur un modèle souris déficientes en LT et nourries avec une alimentation riche en graisse, une élévation de l'inflammation et un plus haut degré de résistance à l'insuline comparé aux souris sauvages. De plus, la restauration de la présence des Th2 spécifiquement diminue le poids des souris, l'inflammation du TA et améliore la sensibilité à l'insuline. L'équipe a finalement démontré que les cellules **Th2** sont responsables de la diminution de l'inflammation et de la résistance à l'insuline (Winer et al., 2009).

Chez les individus obèses, le nombre de **LT-CD8⁺** présent dans le TA est multiplié par 2 voire 3 par comparaison au TA d'individus normo-pondérés. De même la sécrétion d'IFN- γ et de granzymes est fortement augmentée dans le TA des souris obèses. De plus, l'infiltration des LT-CD8⁺ dans le TA précède celle des macrophages (Rausch et al., 2008). En effet, Nishimura et son équipe ont montré qu'une déplétion des LT-CD8⁺ sur un modèle de rongeur améliore en partie la sensibilité à l'insuline alors que le transfert de LT-CD8⁺ chez des animaux déficients conduit à une hausse de l'infiltration des macrophages et au développement d'une insulino-résistance (Nishimura et al., 2009). L'infiltration des lymphocytes T-CD8⁺ semble être un facteur clé pour déclencher la déplétion des lymphocytes Treg. En effet, contrairement aux cellules Th1 et LT-CD8⁺, le nombre de **Treg** est diminué dans le TA en cas d'obésité (Feuerer

et al., 2009). Une déplétion des Treg dans un modèle murin augmente la résistance à l'insuline et la production locale et systémique de cytokines pro-inflammatoires. En revanche, un apport exogène *in vivo* par injection intra-péritonéale d'IL-2 stimule la population de Treg et augmente l'expression du transcrite et de la protéine IL-10. Plusieurs mécanismes de régulation de l'inflammation du TA par les Treg sont suggérés. D'une part, ils réduisent la polarisation des macrophages en M1 et préviennent la différenciation des LT en Th1 (Feuerer et al., 2009).

➤ Les lymphocytes B

Le nombre de LB présent dans le TA est augmenté (notamment les LB producteurs d'IgG) au cours de l'obésité. Il a été montré que des souris obèses déficientes en LB retrouvent une sensibilité à l'insuline et réduisent leur état inflammatoire (Winer et al., 2011). Par ailleurs, chez des animaux obèses, les taux d'anticorps IgG2c sont élevés. Inversement, l'injection d'IgG2c chez des animaux sains provoque une augmentation de l'inflammation du TA et le développement d'une insulino-résistance (Winer et al., 2011). Le recrutement des LB précède également celui des macrophages dans le TA, suggérant que la présence des IgG2c pourrait être un facteur impliqué dans la polarisation des macrophages en M1 (Duffaut et al., 2009).

➤ Les macrophages

Le nombre de macrophages du TA corrèle positivement avec l'IMC, la taille des adipocytes et la production de cytokines pro-inflammatoires (en particulier TNF- α et d'IL-6) (Denison et al., 2010). L'infiltration macrophagique du tissu adipeux au cours de l'obésité semble plus particulièrement impliquée dans le maintien de l'inflammation chronique. En effet, l'infiltration macrophagique se produit relativement tard dans la progression de l'obésité. Sur le modèle souris, il a été démontré que l'obésité induit une augmentation de l'expression d'antigènes spécifiques à la surface des macrophages tels que F4/80, CD11b, CD11c qui signe un phénotype M1. Cependant, ce ne sont pas les macrophages M2 déjà résidants dans le TA qui évoluent vers un phénotype M1. Ce sont les **monocytes** nouvellement recrutés en grand nombre dans le TA en cas d'obésité qui se différencient en macrophage M1 (Nguyen et al.,

2007). L'excès de lipides et d'adipokines produit par les adipocytes hypertrophiés semble impliqué dans la différenciation en sous-type M1, *via* l'activation des récepteurs toll-like (TLR), notamment TLR4. L'activation de TLR4 participe à l'induction d'un stress du réticulum endoplasmique et à l'activation de l'inflammasome chez l'Homme et la souris au cours de l'obésité (Vandanmagsar et al., 2011).

En plus des changements phénotypiques, l'obésité altère aussi la morphologie et la localisation des macrophages. Contrairement aux macrophages M2 répartis dans l'ensemble de la fraction du stroma vasculaire, les sous-types M1 s'agrègent en couronne autour des gouttelettes lipidiques des adipocytes nécrotiques. Cette agrégation conduit à la formation des cellules spumeuses (Prieur et al., 2011).

➤ Les cellules dendritiques

Il a été démontré sur des modèles murins obèses, que l'alimentation riche en gras augmente le contenu en cellules dendritiques (DC) du TA. De plus, l'expression des antigènes spécifique des DC (CDc, CD83) est plus élevée dans le TA sous cutané des individus obèses comparé aux individus contrôles. Des études récentes montrent que l'augmentation des DC dans le TA pourrait jouer un rôle clé dans la différenciation des lymphocytes T au cours de l'obésité par leur propriété de cellules présentatrices d'antigènes (Bertola et al., 2012).

➤ Les mastocytes

Le nombre de mastocytes est significativement augmenté dans le TA murin et humain au cours de l'obésité. L'infiltration des mastocytes dans le TA semble associée à la présence des macrophages. En effet, des souris déficientes en mastocytes et soumises à une alimentation riche en graisses ne présentent pas d'infiltration excessive de macrophages dans le TA et ont une sensibilité à l'insuline améliorée accompagnée d'une perte de poids. En revanche, la reconstitution de la population en mastocytes sur ce même modèle est suivie d'une résistance à l'insuline (Liu et al., 2009). Il semblerait que l'IL-6 et l'IFN- γ joue un rôle important dans ce processus. En effet, dans des modèles de souris invalidées pour ces gènes, la reconstitution

de la population de mastocytes n'altère pas la sensibilité à l'insuline.

➤ Les éosinophiles

L'obésité réduit la proportion d'éosinophiles dans le TA ce qui conduit à une diminution de la différenciation des Th2 et une diminution de la polarisation des M2 favorisant ainsi le statut inflammatoire du TA (Wu et al., 2011). Néanmoins, très peu d'études se sont intéressées aux mécanismes moléculaires impliqués dans les potentiels effets du recrutement des éosinophiles dans le statut inflammatoire lié à l'obésité.

L'ensemble des cellules immunitaires impliquées dans la modulation de l'inflammation sont résumées dans la **figure 28**.

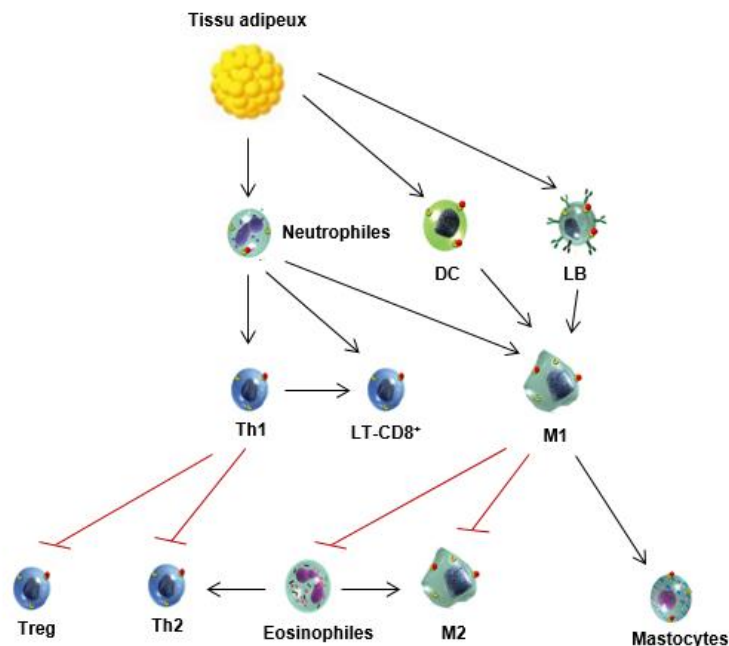


Figure 28 : Activation chronologique des cellules immunitaires lors de l'inflammation du tissu adipeux

2. Obésité et profil cytokinique du tissu adipeux

L'origine principale de la production des cytokines pro- et anti-inflammatoires est le TA. Cependant, les macrophages infiltrés dans le TA participent activement à l'inflammation du TA. Les cytokines majeures responsables de l'inflammation chronique sont la « triade inflammatoire » **TNF- α , l'IL-6, et IL-1 β** . Cette triade est connue pour ses effets négatifs d'une

part, localement sur l'intégrité des adipocytes hypertrophiques et d'autre part dans tout l'organisme *via* l'activation des processus inflammatoires.

Le TNF- α est une molécule aux effets pléiotropes qui joue un rôle central dans l'inflammation, le développement du système immunitaire, l'apoptose et le métabolisme des lipides. Les taux circulants de TNF- α sont fortement augmentés en cas d'obésité et diminuent lors d'une perte de poids. Dans le TA, le TNF- α favorise la sécrétion d'autres cytokines pro-inflammatoires telle que l'IL-6 et à l'inverse, réduit la synthèse de cytokines anti-inflammatoires telle que l'adiponectine. De plus, il induit l'apoptose des adipocytes et favorise l'insulino-résistance par l'inhibition de la voie de signalisation de l'insuline. En effet, l'excès de TNF- α conduit à la phosphorylation (par la kinase JNK) de la protéine IRS-1 sur des résidus Ser à la place des résidus Tyr empêchant la reconnaissance des partenaires en aval de la cascade de signalisation de l'insuline (Hotamisligil et al., 1996).

L'IL-6 est une cytokine importante pour la transition entre une inflammation aiguë et une inflammation chronique. Elle contribue donc activement à l'établissement de l'inflammation chronique en cas d'obésité mais aussi à la résistance à l'insuline, *via* son effet inhibiteur sur l'activation du facteur IRS-1 (Kern et al., 2018).

L'IL-1 β est une cytokine faisant partie de la superfamille des IL-1 (comprenant également IL-18 et IL-33) (Lee et al., 2016). IL-1 β exerce des effets pro-inflammatoires en stimulant l'expression des facteurs de transcription tels que NF- κ B et AP-1. Elle favorise également l'expression de HIF-1 par l'activation de la voie de signalisation de l'inflammation NF- κ B/ Cyclo-oxygenase-2 (COX-2) (Jung et al., 2003). D'autre part, l'IL-1 β favorise la synthèse d'autres cytokines telle que l'IL-6. IL-1 β est formée à partir de son précurseur, le pro-IL-1 β inactif mûré par l'inflammasome. De cette manière, l'IL-1 β et le système « inflammasome » deviennent des marqueurs intéressants pour l'étude de l'inflammation chronique liée à l'obésité (Stienstra et al., 2012). L'inflammasome fait partie du système immunitaire inné et semble être activé en cas d'inflammation de bas grade. C'est un senseur macromoléculaire impliqué dans l'initiation de la réponse inflammatoire. La reconnaissance par l'inflammasome de divers signaux délétères entraîne l'activation de la caspase-1 qui par la suite, induit la sécrétion de cytokines

pro-inflammatoires dont l'IL-1 β . L'inflammasome est un heptamère formé de monomères contenant des récepteurs Nod-like (NLR), des protéines adaptatrices ASC et l'enzyme caspase-1. Un membre des NLR, le NLRP3 serait impliqué dans le stress métabolique, la résistance à l'insuline et le DT2. Dans le TA, l'activation de l'inflammasome contenant NLRP3 en cas d'obésité conduit à la stimulation des lymphocytes T *via* les macrophages et à l'altération de la sensibilité à l'insuline (Church et al., 2008; Dagenais et al., 2010; Vandanmagsar et al., 2011).

L'IL-10 est une cytokine classiquement connue pour son rôle immunosuppresseur en inhibant l'action des cellules Th1 par la réduction des niveaux de cytokines telles que l'IL-6, l'IFN- γ et le TNF- α (MacKenzie et al., 2013). L'IL-10 favorise en parallèle la polarisation M2 des macrophages du tissu adipeux (Xie et al., 2014). De manière surprenante, il a été montré que les taux d'IL-10 sont positivement corrélés à l'obésité. De plus, il semble que cette cytokine soit majoritairement produite par les macrophages de sous-type M1 et son expression est positivement régulée par le TNF- α . Ces données suggèrent que l'IL-10 pourrait être régulée positivement par l'environnement pro-inflammatoire causé par l'obésité afin d'atténuer en retour la réponse inflammatoire dans le TA (Acosta et al., 2019).

Le facteur MCP-1, sécrété par les adipocytes hypertrophiés, joue un rôle dans l'attraction des monocytes circulant vers le TA. La sécrétion locale et plasmatique de MCP-1 est nettement augmentée chez les individus obèses (Kim et al., 2006). De plus, un dysfonctionnement dans la sécrétion de MCP-1 (mutation, surexpression...) observé dans différents modèles animaux montre une altération de l'accumulation des macrophages dans le TA et le développement d'une insulino-résistance. Néanmoins, ces résultats sont controversés. Une autre équipe a montré que MCP-1 ne semble pas être indispensable au processus d'accumulation des macrophages et à l'apparition de l'insulino-résistance. En effet, MCP-1 semble médié ses effets essentiellement en se fixant sur son récepteur *C-C chemokine receptor (CCR) type 2*. Cependant, il a été démontré qu'une invalidation du gène *CCR2* sur des souris ne rétablit pas une accumulation « normale » de macrophages dans le TA et ni la sensibilité à l'insuline. Ces résultats suggèrent que ces processus observés en cas d'obésité ne seraient pas exacerbés

via la signalisation MCP-1/CCR2. C'est pourquoi d'autres études se sont intéressées au récepteur CCR5. L'équipe de Kitade et al, a décrit l'implication de ce récepteur dans la modulation de la réponse inflammatoire et de l'insulino-résistance associée à l'obésité. En effet, une invalidation du gène *CCR5* chez des souris rendues obèses par l'alimentation, révèle un effet protecteur i) par la réduction de l'accumulation des macrophages et ii) par un changement du sous-type M1 pro-inflammatoire au sous type M2 anti-inflammatoire (Kitade et al., 2012).

Les adipokines participent également au statut inflammatoire du TA au cours de l'obésité.

Les effets pro-inflammatoires de la **leptine** sont bien décrits dans la littérature et concernent à la fois l'immunité acquise et l'immunité adaptative. Lors de la réponse immunitaire adaptative, il a été observé que les taux sériques de leptine augmentent au cours d'infection aiguë, d'inflammation aiguë et de septicémie (Otero et al., 2005). Plusieurs études ont également démontré chez le rat et l'Homme que les taux sériques des cytokines telles que le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-1 β sont positivement corrélés à l'expression de la leptine (Boden et al., 1997; Faggioni et al., 2001). De plus, l'exposition *in vitro* des cellules adipocytaires 3T3-L1 au TNF- α induit une augmentation de la synthèse de leptine (Kirchgessner et al., 1997). Enfin, la leptine est produite par des cellules de l'inflammation telles que les macrophages, ce qui suggère que cette hormone se comporte comme une cytokine inflammatoire et participe aux processus de l'inflammation par des actions directes paracrines ou autocrines sur les cellules immunitaires (Sanna et al., 2003). L'étude de la structure de la leptine et de son récepteur, permet de classer la leptine dans la superfamille des cytokines de classe I et suggère que la leptine pourrait également participer à la modulation du système immunitaire (Tartaglia, 1997; Tartaglia et al., 1995; Zhang et al., 1997).

Dans les monocytes et les macrophages (qui expriment le récepteur LEPR), la leptine régule positivement i) la fonction phagocytaire, ii) l'expression de molécules d'adhésion et iii) la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-12 (Gainsford et al., 1996; Loffreda et al., 1998). En effet, des études menées chez des rongeurs présentant des mutations sur les gènes LEPR ou LEP, ont révélé un défaut d'activité phagocytaire des

macrophages et une diminution de l'expression des cytokines pro-inflammatoires. En revanche, l'administration de leptine exogène rétablit à la fois la phagocytose et la production de cytokines (Lee et al., 1999). De plus, la leptine *in vitro* stimule la prolifération des monocytes circulants et régule positivement l'expression de marqueurs d'activation, tels que CD25, CD38, CD69 et CD71. De plus, la leptine augmente l'expression des marqueurs *human leucocyte antigen* (HLA)-DR, CD11b, and CD11c dans les monocytes résidents (Zarkesh-Esfahani et al., 2001).

Les DC expriment le gène LEPR et sont également décrites comme des cibles de la leptine (Mattioli et al., 2009). Ainsi, la leptine dans les DC i) favorise la production de cytokines inflammatoires telles que IL-8, IL-12, IL-6 et TNF- α et ii) diminue la production de cytokines anti-inflammatoires telles que MIP-1 α . De plus, la leptine induit des changements fonctionnels et morphologiques dans les DC (surexpression des marqueurs CD1a, CD80, CD83 ou CD86) favorisant leur survie *via* la voie de signalisation PI3K-Akt (Lam et al., 2006). Les neutrophiles expriment également le récepteur de la leptine (Zarkesh-Esfahani et al., 2004). La leptine semble se comporter comme une cytokine de survie pour les neutrophiles (Bruno et al., 2005). De plus, la leptine favorise le chimiotactisme des neutrophiles vers le site inflammatoire (Matarese et al., 2005; Ottonello et al., 2004).

Les cellules NK humaines expriment de manière constitutive les formes longues et courtes de LEPR et il a été démontré que les souris *db^{-/-}/db^{-/-}* présentent une fonction altérée des cellules NK (Laue et al., 2015; Tian et al., 2002). Plus précisément, la leptine favorise la maturation, la différenciation, l'activation et la cytotoxicité des cellules NK. Elle augmente la sécrétion de perforine, d'IL-2 et d'IL-12 et réduit l'expression de l'IL-15 par les cellules NK, conduisant à une réponse pro-inflammatoire (Loffreda et al., 1998).

Il a également été démontré que la leptine module la réponse immunitaire adaptative, qui est classiquement divisée en réponses immunitaires Th1 et Th2 selon le type de cytokines produites par les lymphocytes T. Le rôle de la leptine dans l'immunité adaptative a été obtenu en utilisant les modèles de souris *ob^{-/-}/ob^{-/-}* et *db^{-/-}/db^{-/-}* qui présentent une réponse des LT altérée. L'administration chronique de leptine chez la souris *ob^{-/-}/ob^{-/-}* rétablit la fonction des LT en

augmentant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-2 et l'IFN- γ (Howard et al., 1999). Chez l'Homme, la leptine module non seulement l'activation et la prolifération des LT mais améliore également la production de cytokines pro-inflammatoires (Martín-Romero et al., 2000). En effet, dans les LT naïfs, la leptine augmente *in vitro* la sécrétion d'IL-2 par l'activation des voies MAPK et PI3K. Dans les LT « mémoires », la leptine favorise la transition vers des cellules Th1 et Th17 pro-inflammatoires en augmentant la sécrétion d'IFN- γ , de TNF- α , d'IL-2 et IL-12 et en inhibant la production de IL-10 et d'IL-4 (Martín-Romero et al., 2000; Napoleone et al., 2007). Enfin, La leptine peut agir comme un signal négatif pour la prolifération des Treg (anti-inflammatoires). En effet sur des Treg issu de souris, l'inhibition *in vitro* de la leptine entraîne une prolifération marquée des Treg, confirmant ainsi le contrôle négatif que la leptine exerce sur la prolifération des Treg (Procaccini et al., 2010). Enfin, le rôle de la leptine dans les lymphocytes B est mal connu. Cependant, il a été récemment démontré, dans le tissu adipeux viscéral murin, que les lymphocytes B sont des acteurs essentiels de la régulation de l'inflammation locale et systémique. Les cellules B régulent de manière critique la fonction des LT proinflammatoires en présentant des antigènes aux LT et en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires et des anticorps (DeFuria et al., 2013; Winer et al., 2011). Chez l'Homme, la leptine favorise i) l'homéostasie des LB en inhibant l'apoptose et en induisant la survie cellulaire *via* l'activation de Bcl-2 et de la cycline D1 (Lam et al., 2010) ii) l'activation *in vitro* des LB, en induisant la sécrétion de cytokines inflammatoires (TNF- α et IL-6) et en inhibant la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (IL-10) *via* les voies JAK-STAT et MAPK-ERK1/2 (Agrawal et al., 2011) (**Figure 29**).

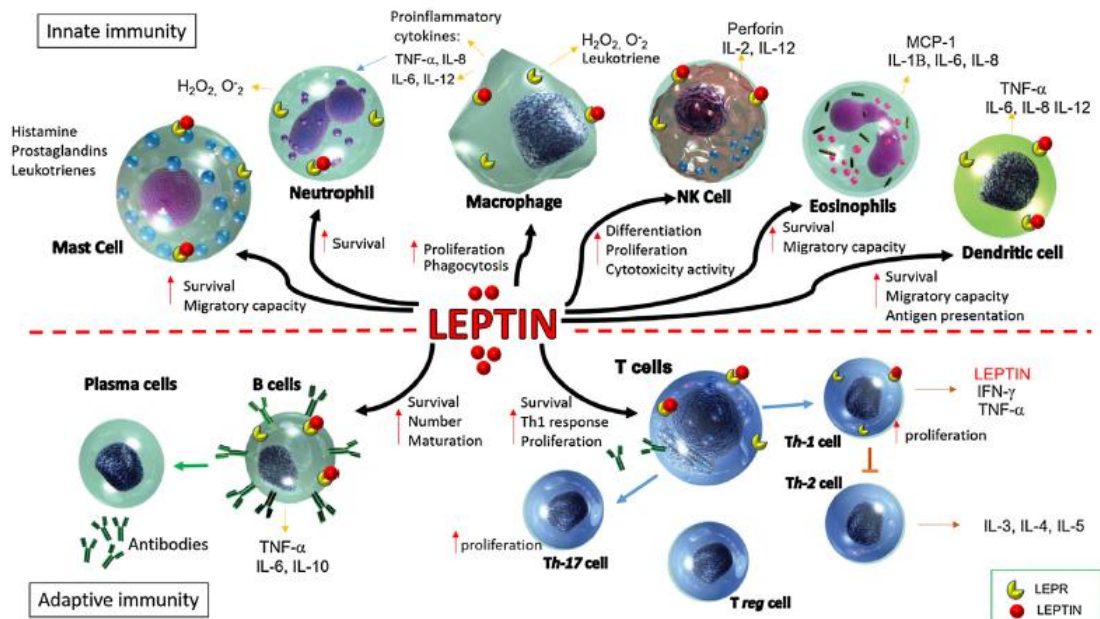


Figure 29 : Effets de la leptine sur les réponses immunitaires innées et adaptatives (D'après Pérez-Pérez et al. 2017)

La leptine stimule la réponse inflammatoire dans de nombreux types de cellules immunitaires. Ce processus est ensuite soutenu par une boucle autocrine de sécrétion de leptine par les cellules Th1.

Il est bien établi que **l'adiponectine** possède des propriétés anti-inflammatoires (Ouchi and Walsh, 2007). Des études *in vitro* ont mis en évidence que l'adiponectine diminue l'inflammation dans les cellules endothéliales, le muscle et les macrophages, majoritairement par l'activation des voies AMPK et de la PKA (Nigro et al., 2013). Les effets anti-inflammatoires de l'adiponectine sont liés à des actions directes d'inhibition de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de cytokines pro-inflammatoires. En effet, l'adiponectine, *via* la voie dépendante de la PKA, régule la production des cytokines inflammatoires en augmentant l'expression du facteur de transcription PPAR γ qui lui-même inhibe l'activité transcriptionnelle de NF- κ B. Par cette voie, l'adiponectine diminue la production d'IL-6, d'IL-1 β , du TNF- α et de la CRP (Ajuwon and Spurlock, 2005; Ouchi et al., 2003; Wulster-Radcliffe et al., 2004). En parallèle, l'adiponectine favorise la production de molécules anti-inflammatoires telle que l'IL-10 et IL-1Ra (Wolf et al., 2004).

Des études expérimentales ont montré que l'adiponectine peut avoir des propriétés anti-athérogènes par cette action anti-inflammatoire (Okamoto et al., 2000; Ouchi et al., 1999, 2001). L'adhésion des monocytes à l'endothélium vasculaire et leur différenciation subséquente en macrophages puis en cellules spumeuses sont considérées comme cruciales dans le développement de la plaque d'athérome. Ouchi et al. ont découvert que l'adiponectine contrôle négativement ces étapes en inhibant spécifiquement la production de TNF- α , une cytokine qui a elle-même des effets directs sur les molécules d'adhésion (Hotamisligil, 1999; Ouchi et al., 1999). Dans une autre étude de Ouchi et al, l'équipe a également montré que l'adiponectine inhibe la transformation des macrophages en cellules spumeuses *in vitro*. Ainsi, l'adiponectine exerce des effets anti-inflammatoires et anti-athérogènes (Ouchi et al., 2001). Dans les **tables 1 et 2** sont résumées de manière non exhaustives les cytokines pro- et anti-inflammatoires synthétisées par le TA et dont la sécrétion est perturbée par l'obésité (Makki et al., 2013).

Adipokines	Distribution	Fonctions
Leptine	Sécrétée par le TA blanc majoritairement, l'hypothalamus, l'épithélium gastrique, les gonades et le placenta	Effets pro-inflammatoires. Régule les dépenses énergétiques et le comportement alimentaire, le stockage des lipides et la sécrétion de l'insuline
Résistine	Peu sécrétée par le TA blanc. Majoritairement secrété par les macrophages et monocytes.	Impliquée l'insulino-résistance. Rôle pro-inflammatoire
Visfatine	Exprimée dans le foie, les muscles, le TA, la moelle osseuse et les lymphocytes	Rôle dans la sensibilité à l'insuline, la sécrétion de l'insuline et propriétés pro-inflammatoires

TNF-α	Exprimé par les macrophages et le TA blanc	Rôle pro-inflammatoire. Impliqué dans l'insulino-résistance, stimule la lipolyse et diminue l'expression de l'adonectine
IL-6	Exprimée par le TA, les macrophages, les muscles squelettiques, les cellules endothéliales et les fibroblastes	Rôle pro-inflammatoire. Impliquée dans l'insulino-résistance
IL-7	Sécrétée par les cellules endothéliales stromales et vasculaires	Cytokine immunitaire homéostatique. Affecte la voie de signalisation de l'insuline
IL-8	Sécrétée par les adipocytes et les macrophages	Chimiotactisme des neutrophiles
IL-1	Sécrété majoritairement par les adipocytes et les macrophages	Chimiotactisme des macrophages et thermogénèse
RBP4	Sécrété par les adipocytes, les macrophages et les hépatocytes	Diminue la sensibilité à l'insuline dans le muscle. Rôle pro-inflammatoire
MCP-1	Sécrété par le TA	Affecte la sensibilité à l'insuline et augmente le recrutement des macrophages dans le TA
IL-10	Sécrété par le TA, les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les Lymphocytes T et B	Améliore la sensibilité à l'insuline et le transport du glucose. Effets anti-inflammatoires

Table 1 : Principales adipokines dont la sécrétion est augmentée en cas d'obésité (D'après Makki et al. 2013)

Adipokines	Distribution	Fonctions
Adiponectine	Sécrétée par le TA	Effets insulino-sensibilisateurs, anti-athérogènes et anti-inflammatoires
Omentine	Exprimée majoritairement dans le TA, le cœur, les poumons, les ovaires, le placenta	Stimule l'entrée du glucose dans les adipocytes. Effets anti-inflammatoires

Table 2 : Principales adipokines dont la sécrétion est diminuée en cas d'obésité (D'après Makki et al. 2013)

Chapitre 2 : le placenta humain

Le placenta est un organe autonome transitoire indispensable à l'établissement et au maintien de la grossesse. Médiateur des échanges physiologiques fœto-maternels, cet organe en grande partie d'origine fœtale, est une allogreffe naturelle dont la mise en place et le développement nécessite un contrôle auto/para/endocrine très fin. Tout dérèglement du dialogue entre la mère et l'embryon conduira à un échec ou à des pathologies de la grossesse.

I. Le développement placentaire

A. L'implantation et le développement précoce du placenta

Le succès de l'établissement d'une grossesse résulte de la synchronisation de deux acteurs biologiques : d'une part l'acteur fœtal, l'embryon et d'autre part, l'acteur maternel, l'endomètre. Une fois l'ovocyte fécondé, les premières divisions cellulaires s'effectuent dans l'oviducte, tout au long de la migration vers l'utérus. Le septième jour après la fécondation, l'embryon atteint le stade blastocyste et entre dans la cavité utérine. Le blastocyste est caractérisé par différentes couches cellulaires. La couche externe est composée de cellules à l'origine du placenta, appelées trophoblastes. Le trophoblaste délimite une cavité interne, le blastocèle, au sein duquel repose la masse cellulaire interne à l'origine de l'embryon.

Sous l'action des sécrétions hormonales i) ovariennes oestrogéniques dans un premier temps, puis œstro-progestatives, et ii) embryonnaires, l'endomètre subit des modifications structurales et moléculaires le rendant **réceptif** à l'implantation embryonnaire. En effet, l'endomètre est un tissu dans lequel l'embryon ne peut s'implanter que pendant une période bien précise appelée la **fenêtre implantatoire**, correspondant aux jours 20 à 24 du cycle ovarien. Cependant, en absence de fécondation, des molécules spécifiques de l'endomètre telle que la fibronectine permettent de « refermer » cette fenêtre implantatoire.

La réceptivité de l'endomètre est associée à des changements morphologiques et

biochimiques qui sont regroupés sous le terme de **décidualisation**. Les modifications morphologiques de l'endomètre sont associées à l'apparition de pinopodes entre les jours 19 et 21 du cycle ovarien. Leur rôle est encore mal connu mais il semblerait qu'ils soient impliqués dans les premières étapes d'apposition de l'embryon à l'endomètre. Parallèlement, les cellules épithéliales et stromales qui composent l'endomètre se multiplient abondamment sous l'influence des œstrogènes. Puis, la présence de progestérone, induit un arrêt de la prolifération cellulaire au profit de la différenciation cellulaire. Cependant, la différenciation s'intensifie uniquement en présence d'un embryon, sous l'influence de l'hormone chorionique gonadotrope humaine (hCG), signal précoce de la grossesse indispensable au processus de décidualisation (**Figure 30**).

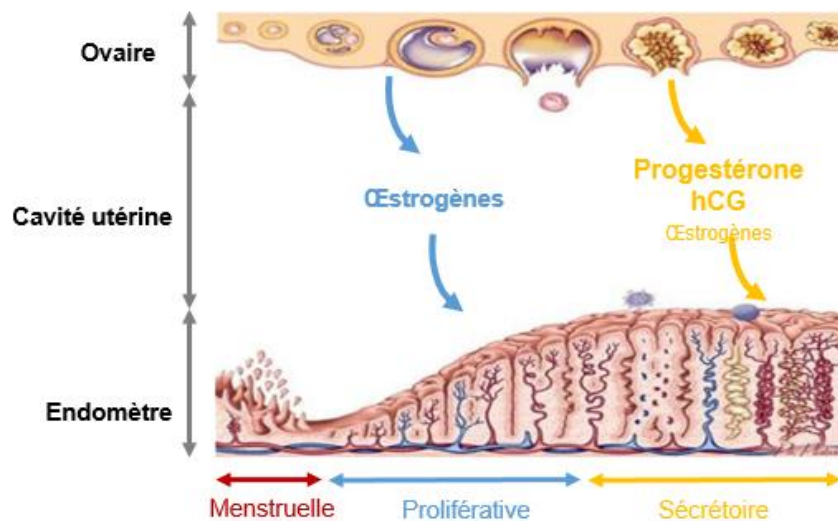


Figure 30 : Etapes précoces du développement embryonnaire et synchronisation endométriale

1. Apposition et adhésion du blastocyste

Lors de son entrée dans la cavité utérine, l'embryon est entouré de la zone pellucide (ZP), composée d'un assemblage de glycoprotéines nommées *zona proteins*. La ZP permet d'éviter une grossesse ectopique par l'implantation de l'embryon dans d'autres régions de l'appareil reproducteur de la femme. Sous l'action de protéases libérées par le trophoblaste, la ZP se rompt pour permettre la sortie du blastocyste. Cet événement est nommé **éclosion** et favorisera l'**apposition** du blastocyste à l'épithélium endométrial. L'**adhésion** de l'embryon à

l'endomètre s'établit au pôle embryonnaire (identifié par la masse cellulaire interne) grâce à des complexes jonctionnels composés de molécules d'adhésion cellulaires incluant des intégrines, des cadhérines et des sélectines (Chaouat et al., 2007).

2. L'invasion trophoblastique

L'invasion trophoblastique est un processus complexe, nécessitant encore une fois un dialogue entre l'embryon et l'endomètre. Au cours de ce processus invasif, le trophoblaste répond à des stimuli prolifératifs et les cellules épithéliales endométriales répondent à des stimuli apoptotiques. Le blastocyste induit la dissociation des cellules épithéliales endométriales en détruisant les jonctions intercellulaires (desmosomes) pour favoriser son infiltration dans le stroma endométrial au cours du processus de **nidation** (Preston et al., 2006). Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus ne sont pas clairement décrit.

Après cette étape, le trophoblaste se différencie en deux populations distinctes au pôle embryonnaire. Le **cytotrophoblaste** (CT), assise cellulaire interne formée de cellules mononuclées et le **syncytiotrophoblaste** (ST), assise cellulaire externe formée de cellules multinuclées à forte activité protéolytique à ce stade. Grâce à cette activité de lyse, le ST permet l'invasion profonde de l'embryon dans l'endomètre utérin. Au neuvième jour post-fécondation, l'embryon est totalement recouvert par la muqueuse utérine au site d'implantation. L'ensemble des étapes de l'implantation embryonnaire sont résumées dans la **figure 31**.

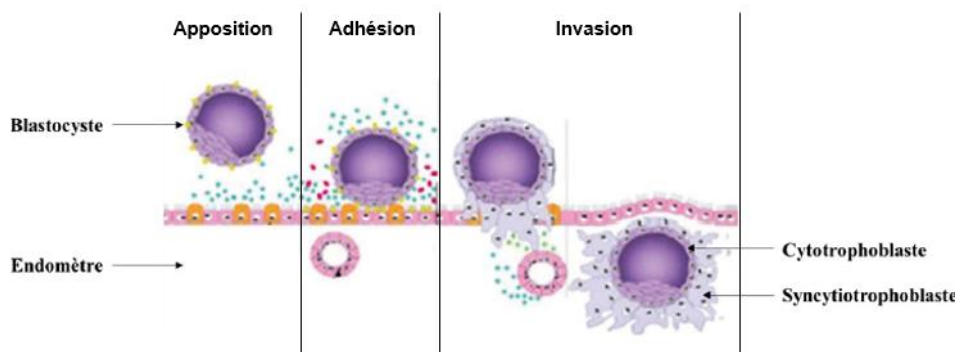


Figure 31 : L'implantation embryonnaire humaine (Modifié d'après Fitzgerald et al. 2008)

3. Le stade lacunaire

Ces premières étapes du développement placentaire décrites dans le paragraphe précédent se poursuivent par le stade pré-lacunaire, caractérisé par le développement de vacuoles qui apparaissent dans la masse syncytiale. Ces vacuoles s'étendent progressivement dans l'endomètre pour former des lacunes. Celles-ci constituent un espace qui deviendra la **chambre intervillieuse**. Les lacunes délimitent également des travées de ST, qui sont les ébauches des **villosités choriales** (Evain-Brion et al., 2010a) (**Figure 32**).

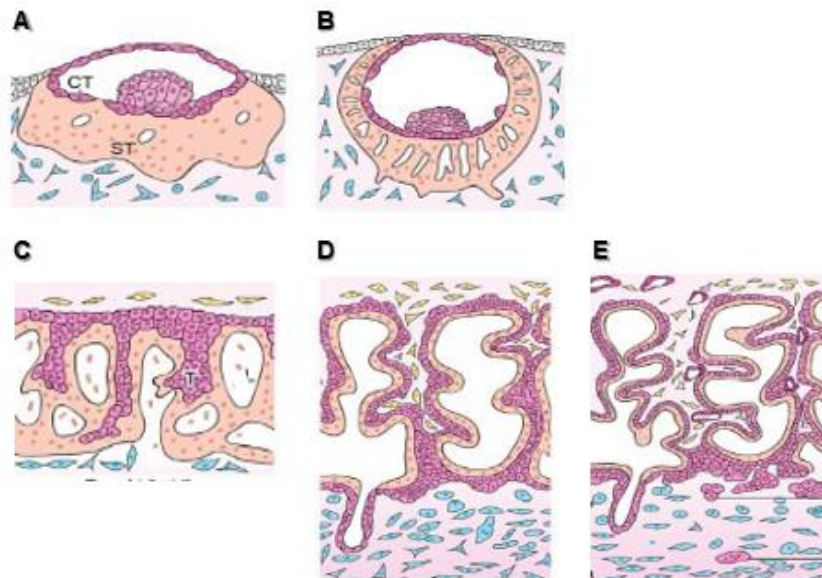


Figure 32 : Développement de la villosité choriale (Modifié d'après Evain-Brion et al. 2011)

(A-B) Neuf jours après la fécondation, des lacunes se forment au sein du syncytiotrophoblaste. Ces événements représentent le stade pré-lacunaire. (C) Les cytotrophoblastes se multiplient et progressent entre les lacunes au sein du ST. (D-E) Formation des travées trophoblastiques, c'est le stade lacunaire.

4. Le stade villeux

Lorsque les travées sont colonisées par les CT, on parle alors de villosités choriales primaires. Après deux semaines, ces villosités choriales sont envahies par des cellules mésenchymateuses allantoïdiennes d'origine embryonnaire pour former les villosités choriales secondaires. Enfin, la villosité tertiaire est caractérisée principalement par une angiogenèse

intense des capillaires fœtaux dans l'axe mésenchymateux. Vers la troisième semaine après fécondation, la villosité choriale a alors acquis sa structure définitive. Elle poursuivra son développement en créant de nouvelles arborescences au cours de la grossesse pour augmenter la surface d'échange. Elle peut être qualifiée de villosité **flottante** lorsqu'elle est libre dans la chambre intervillieuse et de **crampon** lorsqu'elle est ancrée dans l'endomètre. La villosité choriale représente **l'unité structurale et fonctionnelle du placenta**. Les villosités choriales sont composées d'un axe mésenchymateux contenant les capillaires fœtaux et des cellules immunitaires macrophagiques particulières appelées cellules de Haufbauer (Tang et al., 2011). Les villosités sont délimitées par une couche de cellules mononucléées, les **CT villeux** (CTV), qui reposent sur une membrane basale. Les CTV se différencient par fusion cellulaire en une masse cellulaire multinucléée et polarisée, le **ST** (Pidoux et al., 2007). Les CTV situés à la base des villosités crampons se différencient en **CT extravilleux** (CTEV) pour acquérir des propriétés migratoires et invasives (**CTEV invasifs**) (Figure 33).

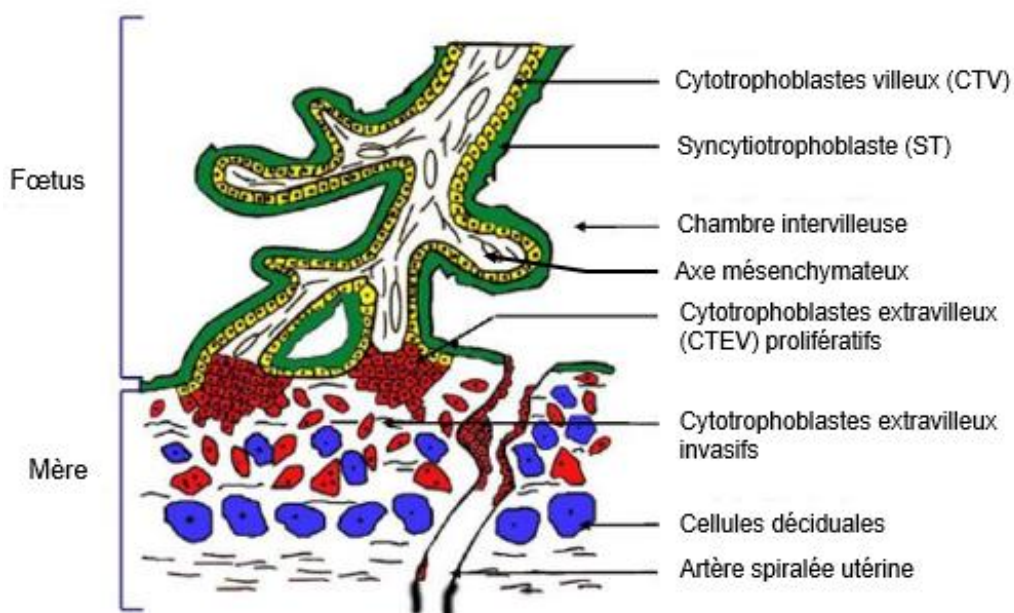


Figure 33 : Structure définitive de la villosité choriale (D'après Fournier and Tsatsaris. 2008)

B. Les lignages trophoblastiques

1. Le cytotrophoblaste vilieux

La différenciation des CTV en ST appelée **syncytialisation**, s'accompagne de modifications morphologiques et biochimiques. Le ST est renouvelé tout au long de la grossesse grâce aux CTV sous-jacents, qui possèdent la capacité de proliférer.

a) La différenciation morphologique

Cette étape débute par une agrégation des CTV impliquant l'expression de protéines de jonction intercellulaire.

En particulier, il a été montré que la protéine *zonula occludens-1* (ZO-1), constitutive des jonctions serrées, joue un rôle majeur dans la fusion des CTV humains (Pidoux et al., 2010). De plus, **les jonctions communicantes** sont également essentielles à la fusion des CTV. La connexine-43 et les Gap junctions sont plus spécifiquement impliquées dans ce processus. L'invalidation de la connexine-43 par ARN interférents diminue fortement la capacité de fusion des CTV humains *in vitro*. **Les jonctions d'ancrage** interviennent également dans la fusion trophoblastique. En effet, le profil d'expression des protéines de ces jonctions telles que l'E-cadhérine et ses partenaires, les caténines α et β , est modifié au cours de la différenciation des CTV. Plus précisément, le processus de fusion est associé à une disparition du complexe E-cadhérine/caténines. (Getsios and MacCalman, 2003). Enfin, des **protéines de fusion** telles que les syncytines 1 et 2 participent également au processus de fusion cellulaire. Les syncytines 1 et 2, d'origine rétrovirale, sont exprimées à l'interface entre le CT et le ST et leur expression augmente fortement au cours de la syncytialisation. L'invalidation par ARN interférant de ces deux protéines dans des cultures primaires de CTV humains aboutit à une inhibition de la fusion cellulaire, soulignant ainsi leur importance dans la différenciation des CTV en ST (Frendo et al., 2003). Au cours du mécanisme de fusion trophoblastique, les syncytines se fixent à des récepteurs de types transporteurs, *alanine serine cysteine*

transporter 2 (ASCT2) pour la syncytine 1 et *major facilitator superfamily domain-containing protein 2* (MFSD2) pour la syncytine 2 (Blond et al., 2000).

b) La différenciation biochimique

La différenciation biochimique des CTV en ST est principalement caractérisée par la sécrétion hormonale qui augmente avec le processus de différenciation. Parmi l'ensemble des hormones sécrétées, l'hCG et la leptine jouent un rôle important dans l'amplification du processus de syncytialisation. En effet, l'hCG stimule la production de leptine, qui stimule la synthèse d'hCG en retour. Ces 2 hormones peuvent être considérées comme des marqueurs de la différenciation cytotrophoblastique (Lunghi et al., 2007; Maymó et al., 2011).

c) Rôle de l'apoptose dans le renouvellement du ST

Le ST est renouvelé en continu au cours de la grossesse. Pour cela, les cellules trophoblastiques vieillissantes sont sélectivement éliminées et remplacées par des cellules plus jeunes. Le processus apoptotique joue un rôle prépondérant dans la différenciation et le renouvellement du ST. En effet, il semblerait que la cascade apoptotique soit activée lors de la différenciation trophoblastique. Il est bien décrit que les processus apoptotiques aboutissent à l'activation d'un effecteur commun, **les caspases** (Carlile et al., 2004; Denecker et al., 2008). On distingue des caspases initiatrices (caspases 8 et 9) et des caspases effectrices (caspases 3, 6 et 7). Il a été démontré que l'inhibition de la caspase 8 supprime la fusion des CTV humains (Black et al., 2004). Par ailleurs, l'invalidation de la caspase 14 par ARN interférents dans la lignée trophoblastique BeWo, augmente l'activation transcriptionnelle du facteur pro-différenciant *glial cell missing factor-1* (GCM-1) et favorise la fusion des cellules BeWo (Wu et al., 2013). La différenciation des CTV en ST semble donc être une phase « d'apoptose différenciante », contrôlée par l'activité des caspases et qui favorise le renouvellement du ST. Le ST est caractérisé par sa membrane apicale formée de nombreuses microvillosités en contact direct avec le sang maternel dans l'espace intervilloux. Il représente le type cellulaire

majeur responsable des échanges fœto-maternels et de la fonction endocrine du placenta. De nombreux systèmes de transports (endocytose, transports actif/passif/facilité) permettent l'entrée d'une grande variété de molécules au sein des villosités chorales. Le rôle endocrine assuré par le ST est quant à lui indispensable à l'établissement et au maintien de la grossesse mais également au développement du fœtus et au déclenchement de l'accouchement.

2. Le cytotrophoblaste extravilleux

Le CTEV est le type cellulaire impliqué dans la migration et l'invasion dans l'endomètre.

La migration trophoblastique est associée i) à la perte de la polarité cellulaire, ii) à une modification du profil de molécules d'adhérence et d'intégrines et iii) à la sécrétion d'enzymes capables de digérer la matrice extracellulaire (MEC). Plus précisément, les protéases telles que les **métalloprotéases matricielles** (MMP) sont impliquées dans la réorganisation de l'adhésion et de l'invasion cellulaires. Les isoformes MMP-2 et MMP-9 sont les isoformes majoritaires exprimées par les CTEV (Bischof et al., 1995). De plus, à la base de la villosité, les CTEV prolifératifs expriment l'**intégrine $\alpha6\text{-}\beta4$** (un récepteur de la laminine), participant aux premières interactions avec l'endomètre. Une fois la membrane basale de l'endomètre atteinte, les CTEV sécrètent des **gélatinases**. Ces protéases digèrent la membrane basale, permettant à l'embryon d'entrer en contact avec la MEC. Dans la décidue, les CTEV invasifs expriment l'**intégrine $\alpha5\text{-}\beta1$** (récepteur de la fibronectine) qui participe à l'ancrage de l'embryon dans l'endomètre et induisent la sécrétion de **collagénases** qui continuent à digérer la MEC, permettant ainsi à l'embryon de s'enfouir dans l'endomètre (Bischof and Campana, 2000). De manière notable, ces phénomènes de prolifération et d'invasion sont des caractéristiques partagées avec les cellules malignes (Fisher and Damsky, 1993). Cependant, contrairement à l'invasion tumorale, l'invasion trophoblastique fait l'objet d'une régulation spatiale et temporelle (Duval et al., 2017). En effet, pour contrebalancer l'activité de dégradation de la MEC, les CTEV expriment également l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (**PAI**) et des inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases matricielles (**TIMPs**) qui permettent de contrôler les activités des protéases. Enfin, ces activités sécrétoires

semblent être modulées par des effets autocrine/paracrine de facteurs de croissance et plus particulièrement du TGF- β (Graham, 1997). Par ailleurs, il semblerait également que le facteur de croissance analogue à l'insuline 2 (IGF-2) soit impliqué dans le processus invasif. En effet, ce facteur est abondamment exprimé par les trophoblastes du front invasif. De plus, l'IGF-2 induit la migration des CT humains en culture *in vitro* (Hamilton et al., 1998).

D'autre part, les cellules déciduales participent activement à la régulation de la migration trophoblastique. En effet, les cellules déciduales sécrètent des facteurs solubles tels que le VEGF, l'IGF-1, le LIF, IL-1, l'IL-6 et l'EGF, qui modulent la synthèse des protéases (Bischof and Campana, 2000).

Enfin l'invasion trophoblastique est contrôlée et limitée au tiers supérieur du myomètre grâce à la différenciation des CTEV en **cellules géantes** statiques composant le « lit placentaire ». De plus, certains CTEV invasifs colonisent les parois des artères spiralées utérines et détruisent la tunique musculaire lisse artérielle. Ils sont ainsi appelés **CTEV endovasculaires**, Les CTEV colonisent également la lumière artérielle et formant un bouchon à l'entrée de l'artère spiralée utérine au cours du premier trimestre de grossesse. L'ensemble des différents types cellulaire du lignage trophoblastique est présenté dans la **figure 34**.

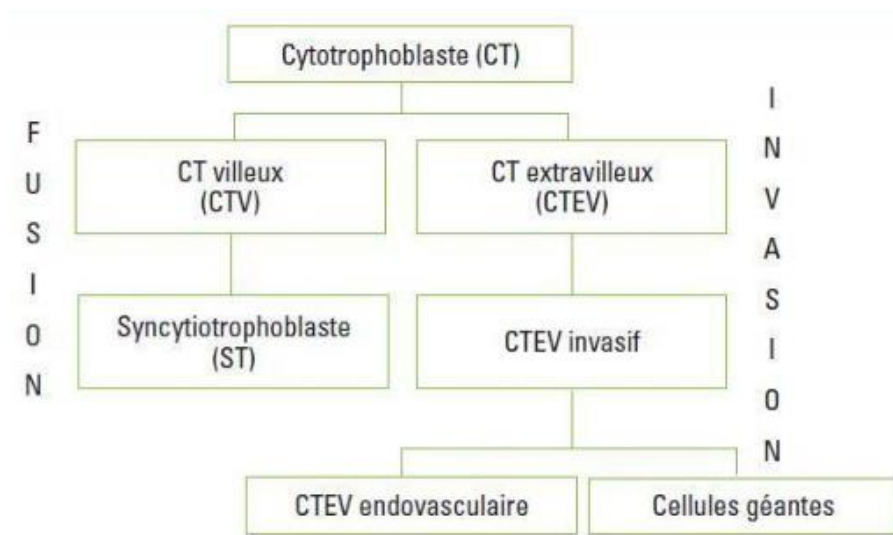


Figure 34 : Voies de différenciation des lignages trophoblastiques humains (D'après Fournier and Tsatsaris. 2008)

C. Mise en place de la circulation placentaire

1. La circulation foétale

Les premiers signes de vasculogénèse (formation des premiers vaisseaux) apparaissent au 21^{ème} jour après la fécondation par la différenciation des précurseurs de cellules endothéliales, les angioblastes. Cette différenciation est induite par le *vascular endothelial growth factor-A* (VEGF-A) produit en particulier par les trophoblastes. Le VEGF-A agit *via* deux récepteurs, *VEGF receptor 1/2* (VEGFR1/2). Le VEGF-A est également un puissant activateur de la prolifération des cellules endothéliales. Par ailleurs, le placenta produit le *placental growth factor* (PlGF) et l'angiopoïétine, deux puissants inducteurs de la formation de nouveaux vaisseaux (Charnock-Jones et al., 2004).

2. La circulation maternelle

L'endomètre est irrigué par des artères basales situées dans la zone profonde de la muqueuse et les artères spiralées qui atteignent la surface de la muqueuse. Ces dernières subissent un remodelage important liées à l'invasion trophoblastique endovasculaire. En effet, des bouchons de CTEV endovasculaires se forment à la sortie des artères spiralées empêchant l'entrée d'éléments figurés du sang maternel pendant la majeure partie du premier trimestre de grossesse. Le développement placentaire se fait donc en présence de concentrations faibles en oxygène. Cet état hypoxique représente une condition favorable à la vasculogénèse, à l'angiogénèse et à la prolifération des cytotrophoblastes. De plus, l'hypoxie placentaire limite la production de radicaux libres qui sont tératogènes. En effet, le placenta ne présente pas encore de système de défense antioxydant. En outre, à ce stade, la chambre intervillieuse est remplie de sécrétions provenant des glandes endométriales impliquées dans la nutrition **histiotrophe** de l'embryon (Duval et al., 2018). Après 12 semaines d'aménorrhée, les bouchons trophoblastiques disparaissent et l'irrigation de la chambre intervillieuse par le sang maternel se réalise progressivement. Ainsi, le sang maternel est directement au contact des villosités chorales dans la chambre intervillieuse, qui représente un vaste espace d'échange

atteignant 150 à 200 ml (**Figure 35**). Dans l'espèce humaine, les circulations fœtales et maternelles restent séparées jusqu'à la délivrance.

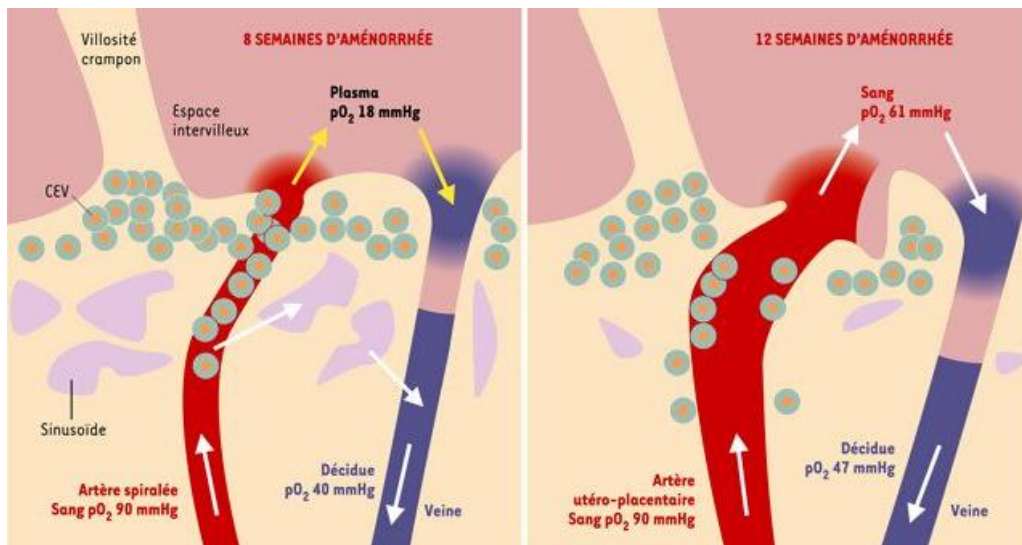


Figure 35 : Représentation schématique du remodelage des artères spiralées utérines (D'après Challier and Uzan. 2003)

À 8 semaines d'aménorrhée, les artères spiralées de la décidue sont bouchées par les cytotrophoblastes extravilloux. Le plasma et quelques hématies maternelles circulent dans l'espace intervilloux (flèches jaunes). Le sang est court-circuité vers un réseau de sinusoides déciduaux et regagne les veines. À 12 semaines d'aménorrhée, les bouchons trophoblastiques ont disparu et le sang des artères utéro-placentaires s'écoule dans l'espace intervilloux. pO₂: pression partielle d'oxygène.

3. Le placenta à terme

Le placenta se présente à terme sous forme arrondie (dite « discoïdale ») de 18 à 20 cm en moyenne, pour 2-4 cm d'épaisseur au centre. Le placenta humain présente deux faces distinctes :

- La face fœtale ou chorale, tapissée par l'amnios, elle laisse apparaître l'arborisation des vaisseaux placentaires, où les artères passent au-dessus des veines.
- La face maternelle ou basale est parcourue de sillons plus ou moins profonds qui délimiteront les cotylédons.

La circulation foeto-placentaire comprend une arrivée du sang maternel dans la chambre intervillueuse *via* les artères utéro-placentaires qui sera repris par les veines

utéro-placentaires. Le sang de l'embryon arrive vers le placenta *via* deux artères ombilicales. A la suite des échanges foeto-maternels, le sang renouvelé est conduit vers le cœur de l'embryon via la veine ombilicale.

Le rapport poids fœtal / poids placentaire varie tout au long de la grossesse et représente un bon indicateur du développement harmonieux du fœtus et de son placenta. A terme, le poids de cet organe représente 1/6 du poids du fœtus, soit environ 500 g (**Figure 36**).

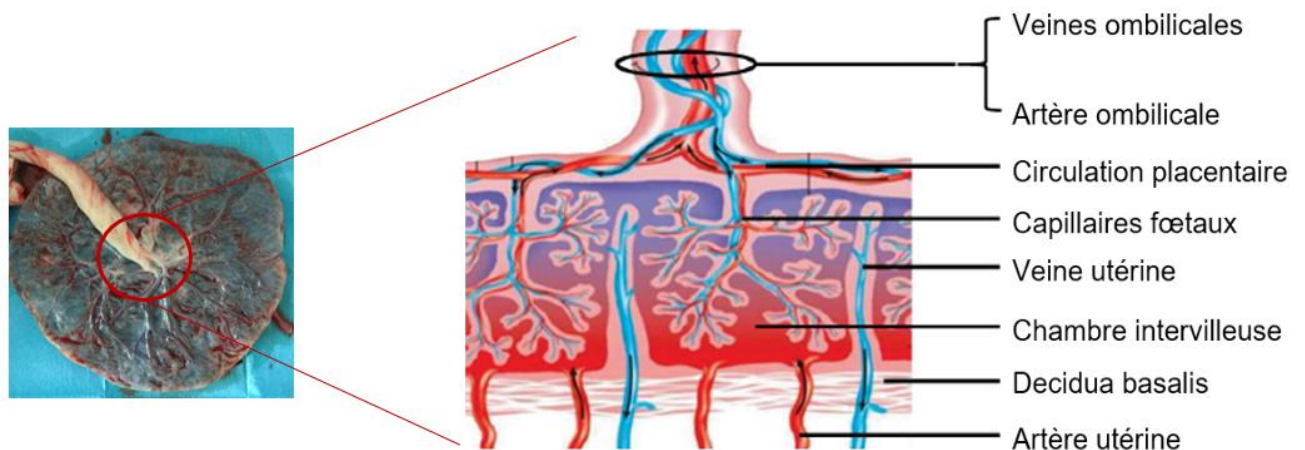


Figure 36 : Placenta à terme et organisation de la circulation sanguine foeto-maternelle

II. Les fonctions placentaires

A. La fonction d'échange

1. Les différents types de transports

Le placenta constitue un filtre sélectif, bloquant ou facilitant le transfert de certaines substances entre les circulations fœtales et maternelles. En conséquence, la croissance fœtale est intimement liée à la fonction d'échange du placenta. La taille du fœtus à la naissance reflète directement le transfert net des solutés et de l'eau par le placenta au cours de la grossesse. La fonction d'échange entre la mère et le fœtus mais également du fœtus à la mère met en jeu différents mécanismes. Au premier trimestre de la grossesse, la nutrition de l'embryon est dite histiotrophe. Les CTEV érodent les glandes utérines pour permettre de

déverser leur contenu nutritif dans la chambre intervillieuse. Ces glandes utérines sécrètent du glycogène, des lipides et des protéines par un mécanisme d'apocytose. Les nutriments sont ainsi contenus sous forme de vésicule dans la chambre intervillieuse (Burton et al., 2007). Ces sécrétions sont réabsorbées par le ST *via* des mécanismes d'endocytose (Evain-Brion et al., 2010b; Filant and Spencer, 2014).

Lors de l'entrée du sang maternel dans la chambre intervillieuse les échanges fœto-maternels permettent une nutrition **hémotrophe** du fœtus. La circulation sanguine maternelle est séparée de la circulation sanguine fœtale par le ST, le CTV, le mésenchyme et l'endothélium des capillaires fœtaux. La barrière placentaire est épaisse au deuxième trimestre (25 à 50 μm) puis elle se réduit progressivement au cours de la grossesse pour atteindre une épaisseur d'environ 3 μm . Dans certaines zones de la villosité, le CTV devient discontinu et le ST entre en contact avec les vaisseaux sanguins fœtaux, créant des zones d'échanges nutritives privilégiées (Mori et al., 2007).

Les échanges placentaires se réalisent, côté maternel, à travers la **membrane plasmique microvillositaire** du ST (MVM). Une fois dans le cytoplasme du ST, les molécules destinées au fœtus ressortent *via* la **membrane plasmique basale** (BM) du côté fœtal. La MVM et la BM représentent les barrières membranaires limitantes dans le transfert fœto-maternel. Les molécules traversent ensuite le stroma vilieux et l'endothélium des capillaires fœtaux avant d'entrer dans la circulation fœtale. L'endothélium des vaisseaux fœtaux est continu. Il permet le passage sans restriction de petits solutés dans les fentes inter-endothéliales. Cependant, la diffusion par ces fentes de petits peptides et de molécules de plus grande taille est plus contrainte (Brownbill et al., 1995; Michel and Neal, 1999).

Certaines molécules de petite taille, lipophiles telles que l'urée et les gaz diffusent librement entre la mère et le fœtus, il s'agit de la **diffusion simple**. Les **transports facilités et actifs** font intervenir des transporteurs membranaires, notamment pour les glucides, les acides aminés, les lipides et les immunoglobulines.

a) *La diffusion simple*

La plupart des échanges de gaz sanguins (oxygène, dioxyde de carbone et azote), de l'urée et de l'éthanol à travers le placenta sont réalisés par diffusion simple. Une différence de concentration fœto-maternelle des molécules ou une différence de gradient électrochimique pour les molécules chargées, conduira à leur diffusion à travers le placenta vers le gradient le plus faible. Les gaz respiratoires se dissolvent facilement à travers toute la membrane plasmique du ST. En raison de la grande surface disponible pour ce processus, cette diffusion est dite à flux limité. En effet, le transfert net sera dépendant de la différence de concentration fœto-maternelle du gaz, qui dépend lui-même des débits utérins et ombilicaux de la circulation sanguine. Par ailleurs, les échanges gazeux entre le fœtus et la mère sont facilités par la présence d'une hémoglobine fœtale caractérisée par une affinité plus importante pour l'oxygène que l'hémoglobine adulte. Cette spécificité est liée à la présence des chaînes peptidiques de la globine de type γ différentes des chaînes β chez l'adulte. Le dioxyde de carbone diffuse de façon passive du sang fœtal vers le sang maternel, de la même manière que l'oxygène, mais vingt fois plus rapidement.

L'eau traverse le placenta par diffusion simple dans le sens d'un gradient osmolaire. Les électrolytes suivent le mouvement de l'eau. Ce transfert nécessite la présence de canaux protéiques transmembranaires, les aquaporines (AQP). Plusieurs aquaporines ont été mises en évidence dans le placenta. AQP1 est exprimée dans la vascularisation fœtale et est exclusivement perméable à l'eau. AQP3 est perméable à l'eau, l'urée et au glycérol. AQP9 est perméable au glycérol, polyols et aux purines. AQP3 et AQP9 sont exprimées dans le ST spécifiquement. La diffusion de l'eau et des composés hydrophiles peut également s'effectuer *via* la voie **paracellulaire**. Cette voie est réalisée grâce à des pores aqueux, remplis d'eau extracellulaire sur la membrane plasmique des cellules (Stulc, 1989). La nature morphologique de ces pores n'est pas claire mais deux hypothèses sont émises. Les pores peuvent être des canaux trans-trophoblastiques, qui ont été visualisés à la fois dans le placenta de cobaye et le placenta humain (Kaufmann et al., 1982; Kertschanska et al., 2000). Alternativement, la voie paracellulaire pourrait potentiellement être réalisée dans des zones de dénudation syncytiale

liées à des dépôts de fibrine (Brownbill et al., 1995; Edwards et al., 1993).

b) Le transport facilité

Les protéines responsables du transport des autres molécules hydrophiles comprennent des **canaux** et des **transporteurs**. Les canaux sont des protéines membranaires qui transportent les ions (K^+ , Cl^- , Na^+ , Ca^{2+}) dans le sens du gradient électrochimique. Il s'agit donc d'un transport passif. De plus le transport ionique est sélectif et saturable. Dans le placenta, le transport facilité permet le maintien de l'homéostasie cellulaire en termes de gradients électrochimiques et de volume des cellules placentaires, particulièrement important pour le syncytiotrophoblaste avec ses taux élevés de flux transcellulaire.

Les transporteurs sont des protéines membranaires qui reconnaissent sélectivement un soluté et le transfère d'un côté à l'autre de la membrane plasmique. Ce mécanisme est également saturable. Le transport du glucose et des lipides fait intervenir ce mécanisme de transport facilité (Evain-Brion et al., 2010b; Lager and Powell, 2012). Ils seront détaillés plus amplement dans les sections suivantes.

c) Le transport actif

Ce système nécessite des protéines de transport pour le passage de diverses molécules contre le gradient électrochimique. On distingue deux types de transport actif : le transport **actif primaire**, qui concerne les espèces ioniques utilisant les pompes telles que la Na^+/K^+ ATPase et la Ca^{2+} ATPase. Dans ce cas, l'énergie est fournie par l'hydrolyse de l'ATP.

Le transport **actif secondaire** se réalise à l'aide de transporteurs pouvant transférer plus d'un soluté à la fois i) dans la même direction, il s'agit des **co-transporteurs** et ii) dans des directions opposées, il s'agit des **échangeurs**. Dans ce cas, l'énergie provient du couplage entre les 2 solutés transportés, l'un dans le sens du gradient électrochimique et l'autre dans le sens contraire (**Figure 37**).

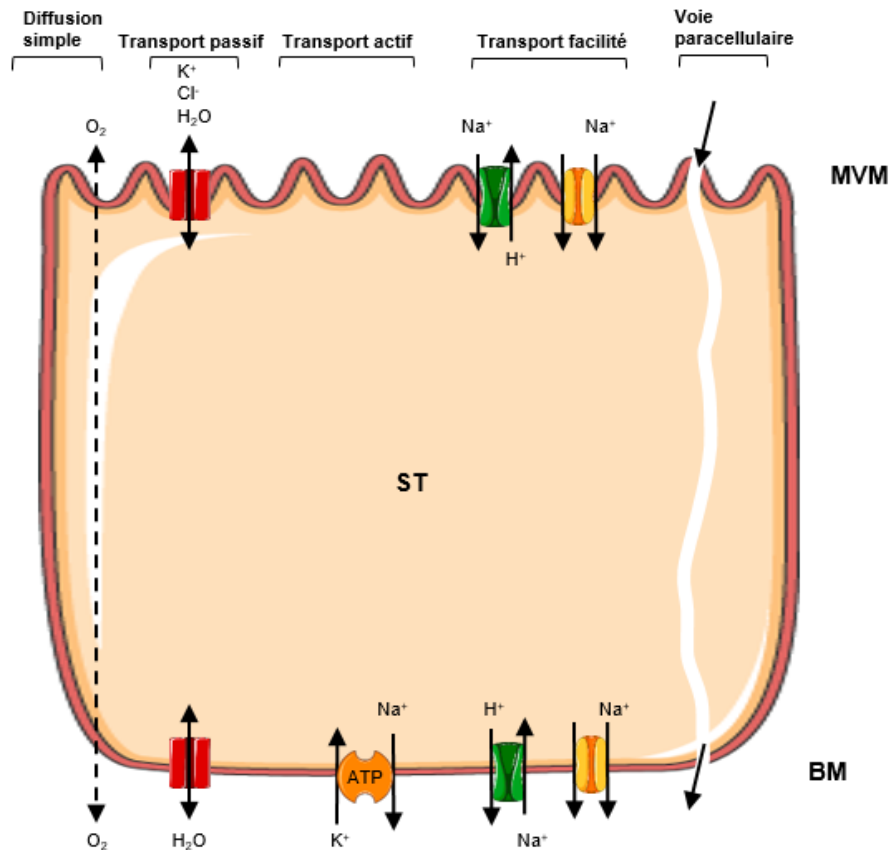


Figure 37 : Différents types de transports dans le syncytiotrophoblaste du placenta humain (D'après Evain-Brion, Malassiné, et Frydman 2010b)

MVM : membrane microvillositaire ; BM : membrane basale ; ST : syncytiotrophoblaste

2. Le transport du glucose

a) Les GLUTs

Le glucose est la source d'énergie majeure pour le fœtus et le placenta. On estime que 60 % du glucose maternel est métabolisé par le placenta pour ses propres fonctions et 40 % est transporté vers le fœtus. Les besoins en glucose du fœtus sont totalement dépendants des apports maternels car le foie fœtal n'est pas capable d'assurer la voie de la néoglucogenèse. Le transport du glucose est un transport passif et facilité par une famille de transporteurs, les GLUTs (Oakley et al., 1972). La famille de transporteurs GLUTs se divise en trois classes : la classe I, comprend les transporteurs les mieux caractérisés (GLUT1 à 4) ; la classe II, comprend les isoformes GLUT5, 7, 9 et 11. Enfin la classe III est peu caractérisée et comprend les isoformes GLUT6, 8, 10, 12, 13, 14.

Certains GLUTs sont exprimés à la surface à la fois de la MVM et de la BM du ST.

Cependant, les niveaux d'expression des GLUTs peuvent être asymétriques entre les deux membranes, suggérant que cette différence joue un rôle dans le contrôle du transfert du glucose vers le fœtus (Baumann et al., 2014). D'autres études ont décrit que, outre le transport du glucose, du galactose et du fructose, les transporteurs GLUTs sont aussi impliqués dans le transfert de substrats non carbohydrates comme la glucosamine, le myoinositol et l'acide urique (Bibert et al., 2009; Maher and Harrison, 1990). Cependant, il est communément accepté que cette large spécificité de substrats s'explique par les différences de cinétique, de localisation et d'expression de ces isoformes GLUTs dans les tissus humains, pour fournir l'énergie requise à chaque type cellulaire. Dans le placenta, de par les fonctions variées assurées par le ST, le stroma villositaire et l'endothélium vasculaire, un changement dans l'expression de cette famille de transporteurs pourrait avoir des conséquences sur l'efficacité des échanges fœto-maternels et donc sur la croissance fœtale.

L'ARNm et la protéine de six isoformes de GLUTs ont été détectés dans le placenta, il s'agit des isoformes GLUT1, 3, 4, 8, 9 et 12. GLUT1 est une isoforme ubiquitaire considérée comme le premier transporteur de glucose dans le placenta à terme. GLUT3, abondamment exprimé dans les tissus à forte demande énergétique, est également fortement exprimé dans le placenta. GLUT9, décrit pour transporter le glucose, le fructose et l'acide urique a été récemment mis en évidence dans le placenta (Phay et al., 2000). Enfin, l'expression de GLUT4 et 12 est étroitement dépendante d'une stimulation par l'insuline. De plus, ces deux isoformes sont exprimées dans le placenta de premier trimestre et ne sont plus détectées dans les placentas à terme. L'implication de GLUT8 dans le transport du glucose est quant à lui quasiment inconnu.

➤ GLUT1

L'expression de GLUT1 augmente tout au long de la grossesse. GLUT1 est localisé principalement dans le ST et dans une moindre mesure dans l'endothélium vasculaire placentaire (Jansson et al., 1995). GLUT1 est localisé dans les deux membranes villositaires

avec une expression trois fois supérieure dans la MVM par rapport à la BM (Jansson et al., 1993). Les mécanismes impliqués dans cette asymétrie d'expression ne sont pas encore connus. Cependant, plusieurs hypothèses sont émises pour expliquer le rôle de cette asymétrie dans le transfert transplacentaire du glucose. En particulier, le transfert à travers la BM pourrait constituer une étape limitante dans le transfert trans-syncytial du glucose vers le fœtus. Cette hypothèse a été confirmée par une étude réalisée sur la lignée trophoblastique BeWo capable de former un syncytium *in vitro*. Dans ces cellules, une inhibition de l'expression du transporteur GLUT1 spécifiquement dans la BM, réduit le transport du glucose. En revanche, une inhibition de l'expression de GLUT1 spécifiquement dans la MVM ne modifie pas le niveau de transfert du glucose (Vardhana and Illsley, 2002). En conséquence, si l'expression placentaire de GLUT1 est altérée lors de la grossesse, il peut en résulter un transport excessif ou insuffisant du glucose qui perturbera la croissance fœtale.

➤ GLUT3

GLUT3 présente la plus grande affinité pour le glucose parmi tous les transporteurs GLUTs. Ainsi, GLUT3 est très « efficace » durant les périodes hypoglycémiques pour protéger le fœtus. Dans le placenta, l'ARNm de GLUT3 est exprimé dans l'endothélium vasculaire, le CT, la MVM du ST et les CTEV (Hauguel-de Mouzon et al., 1997; Jansson et al., 1995). Il est bien démontré que l'expression de l'ARNm de GLUT3 dans le ST diminue fortement avec l'augmentation de l'âge gestationnel (Sakata et al., 1995). Concernant la présence de la protéine GLUT3 dans le CT, le ST et les cellules endothéliales, les études sont contradictoires. Il semblerait que la protéine GLUT3 ne soit pas exprimée par le ST. En effet, une étude réalisée sur des cultures primaires de trophoblastes humains révèle une absence d'expression de la protéine dans les CT (après 18h de culture) et dans le ST (après 66h de culture) (Clarson et al., 1997). En revanche, la protéine GLUT3 semble exprimée dans l'endothélium vasculaire (Hauguel-de Mouzon et al., 1997). D'autre part, le faible nombre d'études ne nous permettent pas à l'heure actuelle de déterminer le rôle précis de GLUT3 dans le transport fœto-maternel du glucose. GLUT3 pourrait contribuer au maintien du gradient de concentration du glucose

dans le placenta et stimuler par ce biais le flux de glucose de la mère vers le fœtus. L'excès de glucose non utilisé serait re-capté de la circulation fœtale par GLUT3 et stocké sous forme de glycogène dans le placenta (Illsley, 2000).

➤ GLUT9

GLUT9 est la seule isoforme pour laquelle il existe deux variants : GLUT9a et GLUT9b. Ces 2 variants transportent le glucose et le fructose.

GLUT9a est exprimé dans la BM, dans la MVM et dans l'endothélium. En revanche, GLUT9b est présent majoritairement dans la MVM. L'implication de GLUT9 dans le transport placentaire du glucose n'est pas clairement établie. Néanmoins Bibee et al, ont montré que l'expression de GLUT9a augmente dans la BM et dans la MVM du ST de placenta issus de femmes présentant un diabète gestationnel et pré-gestationnel, comparée aux femmes non diabétiques (Bibee et al., 2011) (**Figure 38**)

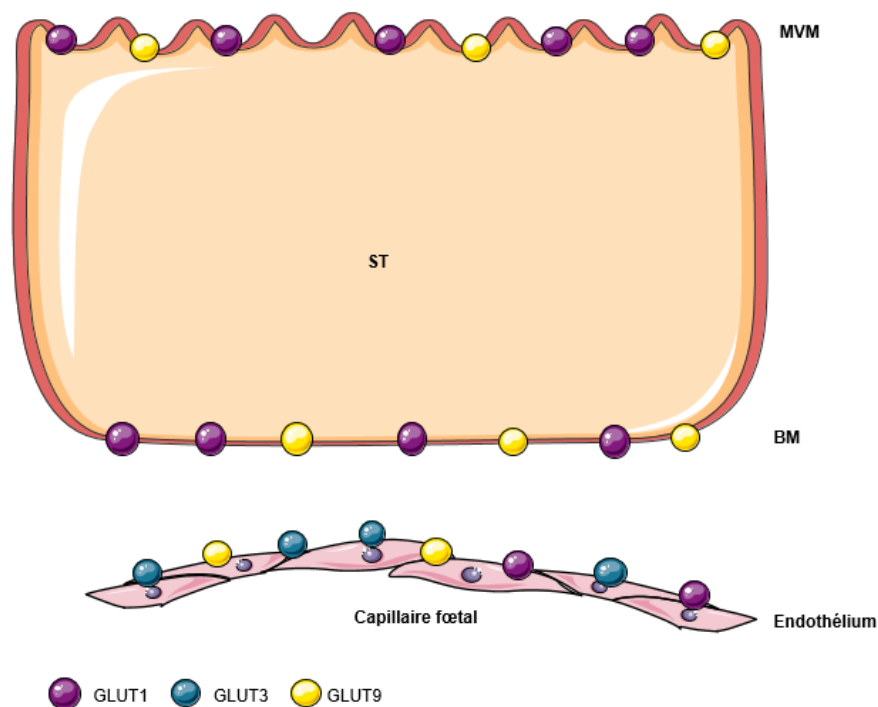


Figure 38 : Localisation des transporteurs GLUTs dans le syncytiotrophoblaste et les capillaires fœtaux du placenta humain (D'après Evain-Brion, Malassiné, et Frydman 2010b)

MVM : membrane microvillositaire ; BM : membrane basale ; ST : syncytiotrophoblaste

b) Régulation du transport du glucose

La régulation du transport de glucose dans le placenta humain est un processus relativement peu connu. La majorité des données concernent le transporteur GLUT1. L'augmentation avec l'âge gestationnel du transport placentaire du glucose est en partie associée à l'augmentation de l'expression de GLUT1. L'*insulin-like growth factor-1* (IGF-1), les glucocorticoïdes, la CRH et l'hypoxie sont les principaux agents régulateurs de l'expression des GLUTs. Baumann et al. ont démontré que l'exposition à l'IGF-1 d'explants placentaires humains à terme stimule *in vitro* l'expression de GLUT1 dans la BM du ST (Baumann et al., 2014). Ces résultats sont appuyés par une étude réalisée sur la lignée BeWo surexprimant l'IGF-1. Dans ces conditions expérimentales, la surexpression d'IGF-1 augmente l'expression des protéines GLUT1, 3 et 8.

Les glucocorticoïdes régulent négativement l'expression des protéines GLUT1 et 3 dans le placenta humain (Hahn et al., 1999). Cependant, il a été démontré que la CRH favorise l'expression de la protéine GLUT1 et inhibe celle de GLUT3 dans des cultures de trophoblastes humains (Gao et al., 2012). Cette régulation semble être spécifique du placenta. Enfin, l'hypoxie chronique *in vivo* observée chez des femmes enceintes vivant à haute altitude, réduit l'expression de GLUT1 dans la BM du ST spécifiquement (Moore et al., 2011). L'ensemble de ces résultats suggèrent qu'une altération de ces régulations fines de l'expression des transporteurs de glucose pourrait être associée à des perturbations de la croissance fœtale.

3. Le transport des acides aminés

Les acides aminés constituent une ressource indispensable pour le fœtus pour réaliser la synthèse des protéines, des nucléotides, des polyamines et des neurotransmetteurs. Ils sont également indispensables au métabolisme énergétique.

Le contrôle du transfert des acides aminés essentiels est particulièrement important pour le développement fœtal. Par ailleurs, les concentrations en acides aminés dans le plasma

maternel sont plus faibles que dans le plasma fœtal (excepté pour le glutamate et l'aspartate). Ainsi, le transport placentaire se réalise contre le gradient de concentration, de manière active, depuis la circulation maternelle jusqu'à la circulation fœtale. De plus, la quantité d'acides aminés transférée au fœtus ne reflète pas toujours la concentration dans le plasma maternel, suggérant un transfert sélectif des acides aminés à travers le placenta (Cetin et al., 2005). Enfin, les concentrations en acides aminés du tissu placentaire sont supérieures à celles du plasma maternel et fœtal (Camelo et al., 2004).

On peut distinguer deux classes de transporteurs des acides aminés : **les transporteurs accumulatifs** et les **échangeurs**. Le système de transport accumulatif favorise l'influx des acides aminés dans les cellules. Le second système permet d'échanger des acides aminés entre le compartiment intracellulaire et le compartiment extracellulaire lors d'un transfert couplé. Ces échangeurs modifient la composition en acides aminés des cellules sans en changer la concentration, afin d'éviter des variations osmotiques tout en intégrant des acides aminés essentiels (Bröer, 2002). D'autre part, on distingue les différents systèmes de transport d'acides aminés par leur dépendance au sodium (Na^+). Ainsi, on relève un co-transport **Na^+ -dépendant** et un co-transport **Na^+ -indépendant** (Jansson, 2001).

Le système de transporteurs Na^+ -dépendant est un transport actif secondaire. Ils utilisent l'énergie générée par la pompe Na^+/K^+ ATPase (Jansson, 2001). Le **système A** est le principal transport Na^+ -dépendant. Il permet le transport de l'alanine, de la sérine, de la glycine, de la glutamine, de la méthionine, de la proline et de la thréonine. On note aussi les **systèmes ASC** pour l'alanine, la sérine et la cystine, le **système N** pour l'histidine, l'asparagine, la glutamine et l'arginine, le **système B^+** pour les acides aminés cationiques et neutres et le **système X_{GA}** pour le glutamate, l'aspartate et la cystéine (Cleal and Lewis, 2008; Evain-Brion et al., 2010b).

Le système de transporteurs Na^+ -indépendant est un transport actif primaire qui comprend les transporteurs de **type y^+** pour la majorité des acides aminés cationiques, le **système L** pour les acides aminés neutres, les systèmes **y^+L** pour les acides aminés cationiques et le **système T** pour les acides aminés aromatiques (Cleal and Lewis, 2008; Evain-Brion et al., 2010b) (**Figure 39**).

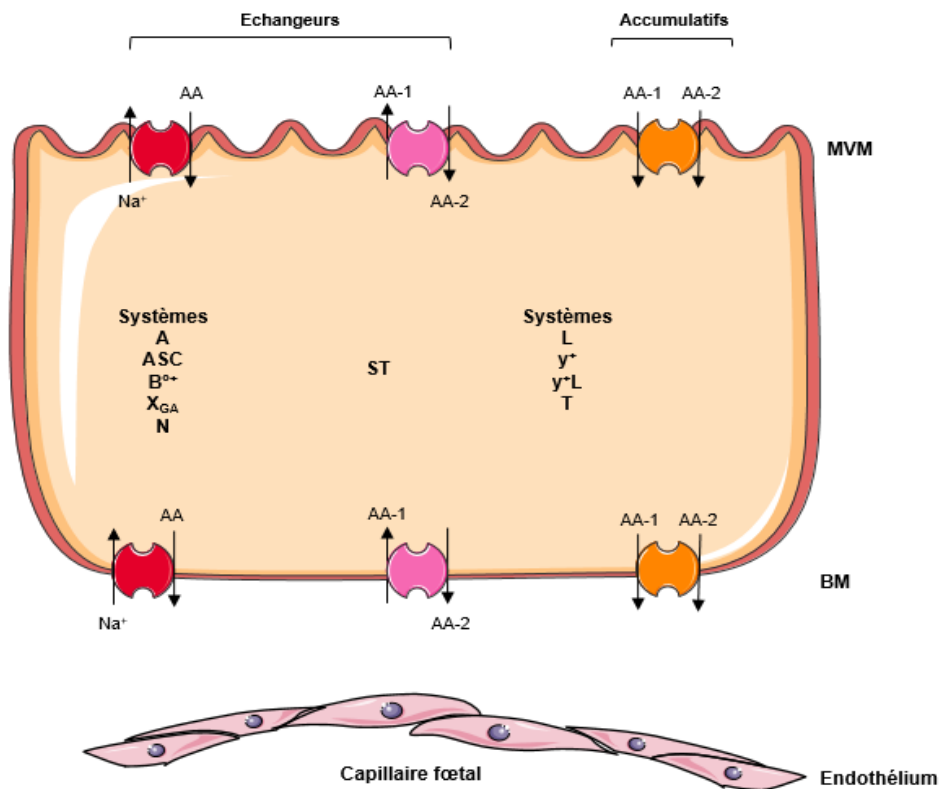


Figure 39 : Différents types de transporteurs d'acides aminés dans le syncytiotrophoblaste du placenta humain (D'après Evain-Brion, Malassiné, et Frydman 2010b)

AA : acide aminé ; MVM : membrane microvillositaire ; BM : membrane basale ; ST : syncytiotrophoblaste

Les mécanismes moléculaires de capture par la MVM des acides aminés sont bien décrits. En revanche, les mécanismes de transport des acides aminés impliqués dans le métabolisme intra-syncytial et dans l'efflux à travers la BM sont encore mal connus. Il est donc important de mieux caractériser ces transporteurs impliqués dans l'efflux des acides aminés vers le fœtus pour évaluer l'impact d'une altération des fonctions de transport placentaires sur la croissance fœtale.

a) *Transport des acides aminés neutres*

Le système A (SNATs) est ubiquitaire et transporte prioritairement les acides aminés neutres non-essentiels, *via* un co-transport avec le Na⁺. Il semblerait que la liaison du Na⁺ précède

celle de l'acide aminé avant d'être transporté simultanément (Mackenzie and Erickson, 2004). Par ailleurs, ce mécanisme de transport est sensible au pH, affichant une activité réduite à un faible pH (Hatanaka et al., 2000). L'activité du système A a été mise en évidence à la fois dans la MVM et la BM du ST. Cependant, le transport maximal par mg de protéine est plus élevé dans la MVM (Hoeltzli and Smith, 1989). La caractérisation moléculaire révèle trois isoformes principales codées par des gènes membres de la famille des transporteurs *solute carrier family 38* (SLC38). Il s'agit des isoformes SNAT1 (*SLC38A1*), SNAT2 (*SLC38A2*) et SNAT4 (*SLC38A4*). Ces transporteurs sont exprimés dans le placenta au premier et au troisième trimestre de la grossesse avec des contributions variables selon l'isoforme. Il a été démontré que l'activité du système A augmente tout au long de la grossesse. Néanmoins les facteurs responsables de cette augmentation d'activité du système A ne sont pas encore établis. Une étude récente montre, par qPCR sur des cultures primaires de trophoblastes issus de placenta à terme, que SNAT1 serait le contributeur majeur de la forte activité de transport des acides aminés dans le placenta à terme (Desforges et al., 2010). De plus, dans cette même étude, l'inactivation du gène *SLC38A1* est associée à une réduction du transport de l'acide α -méthylaminoisobutyrique (MeAIB), un analogue non métabolisable des acides aminés neutres (Desforges et al., 2010). En revanche, l'activité de SNAT4 est plus importante au premier trimestre et diminue à terme et son affinité pour les acides aminés neutres est plus faible que SNAT1, 2 (Desforges et al., 2009). Cependant, SNAT4 est le seul à posséder la capacité d'interagir également avec des acides aminés cationiques de manière Na^+ -indépendante (Hatanaka et al., 2001).

Un autre type de transport Na^+ -dépendant des acides aminés neutres est **le système ASC**, essentiellement localisé dans la BM du ST (Johnson and Smith, 1988). Cependant, une étude décrit une activité des transporteurs ASC dans la MVM du ST (Karl et al., 1991). Néanmoins, l'expression des gènes de ces transporteurs, dont celle de ASCT1, est très faible dans le placenta humain (Shafqat et al., 1993). Le transport de la taurine, un β -acide aminé, a été bien étudié dans le placenta car cet acide aminé exerce divers rôles dans la croissance fœtale, notamment dans le développement du système nerveux central, de la rétine, des reins et du

pancréas (Sturman, 1988; Warskulat et al., 2007). Les concentrations tissulaires placentaires en taurine sont 100 à 200 fois supérieures à celles de la circulation maternelle, suggérant un transport actif efficace à travers la MVM (Karl and Fisher, 1990). Le transporteur de la taurine, TauT a été cloné dans le placenta et décrit comme un membre de la superfamille des transporteurs Na⁺Cl⁻-dépendant (Palacín et al., 1998; Ramamoorthy et al., 1994).

Le système L (LATs) comprend les isoformes LAT1 (SLC7A5), LAT2 (SLC7A8), LAT3 (SLC43A1) et LAT4 (SLC43A2). Il a été décrit que l'expression du transporteur LAT1 est plus élevée dans le placenta à terme par comparaison avec le début de grossesse. La localisation subcellulaire des isoformes LATs est polarisée, avec une expression prédominante de LAT1 dans la MVM et de LAT2, LAT3 et LAT4 dans la BM du ST. Cependant, l'expression de LAT2 a également été décrite, dans une moindre mesure, dans des vésicules isolées de MVM (Cleal et al., 2011; Lewis et al., 2007; Verrey, 2003). Cependant, l'activité des transporteurs LATs a été mesurée dans les deux membranes du ST (Kudo and Boyd, 2001). Par ailleurs, une étude a montré, à l'aide de la technique de perfusion placentaire d'acides aminés radiomarqués, que ces transporteurs jouent un rôle important dans le placenta, en échangeant *via* la BM des acides aminés peu requis pour le fœtus contre des acides aminés placentaires pour lequel le fœtus a une forte demande métabolique (Cleal et al., 2011). Des études préliminaires suggèrent également que des transporteurs du système N tel que TAT1 (SLC16A10) pourraient être de potentiels candidats impliqués dans l'efflux des acides aminés à travers la BM. TAT1 est un transporteur bidirectionnel d'acides aminés aromatiques qui a également une certaine activité d'efflux de leucine. L'expression de TAT1 (ARNm seulement) a été décrite dans le placenta humain (Ramadan et al., 2006).

b) Transport des acides aminés cationiques

Ce type de transporteurs est actuellement peu étudié dans le placenta. Environ cinq systèmes différents seraient impliqués dans le transport des acides aminés cationiques, mais seulement trois ont été caractérisés d'un point de vue moléculaire. Les données de la littérature restent controversées concernant leur présence dans les membranes du ST. Néanmoins il est

clairement établit que **le système y⁺** est le principal transporteur des acides aminés cationiques. Il est principalement retrouvé dans la MVM du ST. **Le système y⁺L** est quant à lui localisé dans la MVM et la BM du ST (Furesz et al., 1995). De plus, le système y⁺L est également capable d'interagir à la fois avec les acides aminés cationiques mais également les acides aminés neutres. **Le système CAT-1** a récemment été cloné et caractérisé comme transporteurs d'acides aminés cationiques, avec une activité très proche du sous-type y⁺. Il est exprimé dans plusieurs types cellulaires dont le placenta (Ayuk et al., 2000). D'autres isoformes à activité y⁺-like ont été identifiés (CAT-2/4). L'expression des ARNm de CAT-1/2 et 4 a été mise en évidence dans des trophoblastes humains en culture et dans les cellules BeWo ce qui suggère que plusieurs membres de la famille des transporteurs CAT seraient exprimés dans le placenta *in vivo* (Kamath et al., 1999).

c) Transport des acides aminés anioniques

Peu d'études dans la littérature se sont intéressées aux transporteurs d'acides aminés anioniques. Une étude réalisée sur des placentas humains perfusés montre que le glutamate et l'aspartate ne semblent pas être transférés depuis la mère vers le fœtus (Schneider et al., 1979). Des études pionnières réalisées sur les fœtus de brebis ont montré que le glutamate est produit à partir de la glutamine synthétisée par le foie fœtal. Il est ensuite assimilé et métabolisé par le placenta (Holzman et al., 1979). Des mesures indirectes réalisées dans le trophoblaste humain, telles que le degré d'oxydation du glutamate et l'absence de transfert net du glutamate dans la circulation ombilicale du placenta, suggèrent que le glutamate placentaire provient de la glutamine fœtale (Broeder et al., 1994; Cetin et al., 1988) (**Figure 40**).

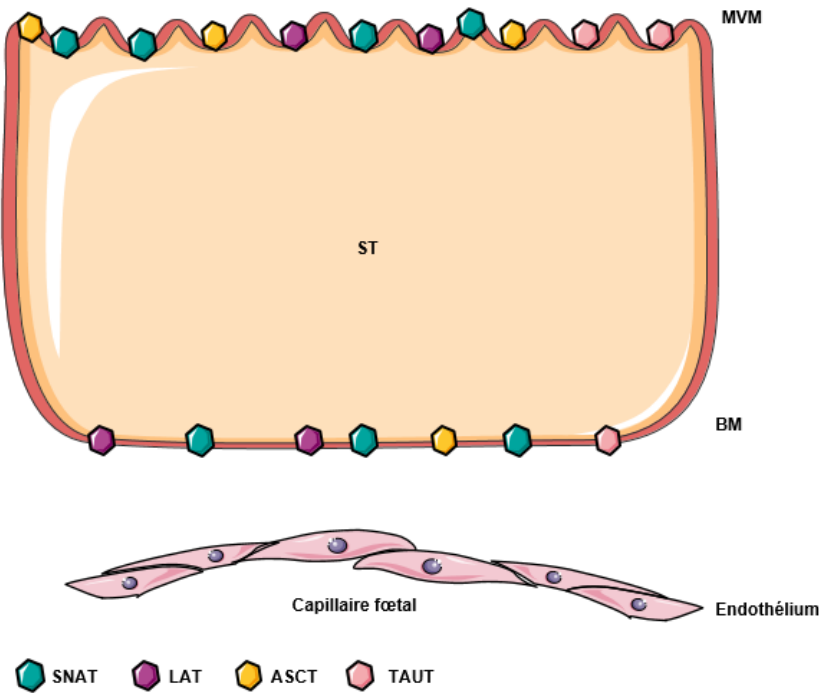


Figure 40 : Localisation des principaux transporteurs d'acides aminés dans le syncytiotrophoblaste et les capillaires fœtaux du placenta humain (D'après Evain-Brion, Malassiné, et Frydman 2010b)

Les transporteurs d'acides aminés présents sur la membrane des capillaires fœtaux et responsables du transfert dans la circulation fœtale sont encore inconnus. MVM : membrane microvillositaire ; BM : membrane basale ; ST : syncytiotrophoblaste

d) Régulation du transport des acides aminés

Les capacités de transfert placentaire des acides aminés sont régulées en réponse à des signaux endocrines provenant à la fois de la mère et du fœtus. Les mécanismes de régulations du transport des acides aminés peuvent donc varier entre le début et la fin de grossesse. Cependant, la plupart des études porte sur le placenta à terme.

Il est clairement établi que **l'IL-6 et le TNF- α** (à des concentrations physiologiques) stimulent *in vitro* l'activité des SNATs dans les cellules trophoblastiques humaines (Aye et al., 2015; Jones et al., 2009). Les mécanismes moléculaires impliqués dans les effets du TNF- α sont peu connus. En revanche, les effets positifs de l'IL-6 sur l'activité des SNATs sont dépendants du facteur de transcription STAT3 (Jones et al., 2009). Une autre cytokine, **la leptine**, est décrite comme un régulateur positif de l'activité des SNATs. Cet effet positif, mis en évidence

in vitro sur des explants de placentas humains est médié par la voie STAT3 (Jansson et al., 2003; von Versen-Höyneck et al., 2009a). Cependant, ces effets semblent être limités à une stimulation aigue. En effet, une exposition longue à la leptine n'affecte par l'activité des SNATs (von Versen-Höyneck et al., 2009a). L'adiponectine est également décrite comme un régulateur clé du transport des acides aminés. **L'adiponectine**, sous sa forme longue, inhibe le système A et sous sa forme courte globulaire stimule le système A (Jones et al., 2010). De plus, il a été décrit qu'un traitement *in vivo* avec la forme longue de l'adiponectine sur une période de 4 jours entraîne une réduction de la croissance foetale associée à une diminution de l'activité du système L et de l'expression des transporteurs LATs dans le placenta murin (Rosario et al., 2012).

L'insuline et l'IGF-1 sont également des facteurs stimulateurs des SNATs. En effet, sur un modèle de cellules trophoblastiques à deux dimensions, Bloxam et al, ont démontré que l'addition d'IGF-1 du côté apical augmente l'accumulation intracellulaire de l'AIB (substrat du système A) et semble en contrepartie réduire le taux de transfert du côté basal. Ces résultats indiquent également que la captation des acides aminés par la MVM est la première étape dans le transfert placentaire de ces nutriments. Néanmoins, ces résultats soulignent le fait qu'une augmentation de la captation des acides aminés n'est pas forcément suivie d'une augmentation du transport net des acides aminés vers le fœtus (Bloxam et al., 1994). En revanche, les études sont contradictoires concernant l'effet de l'insuline sur le système L. Récemment, une étude a démontré que l'insuline n'a pas d'effet sur l'expression et l'activité du système L (Roos et al., 2009a). Enfin, dans un modèle de souris présentant une délétion d'IGF-II spécifiquement dans le placenta, l'expression et l'activité des transporteurs SNAT4 et GLUT3 est diminuée (Constância et al., 2005).

Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation du système A et du système L semblent faire intervenir la voie **mTOR**. Cette voie de signalisation est considérée comme un intégrateur des signaux moléculaires maternel, foetal et placentaire (Roos et al., 2009a). Il a été démontré *in vitro*, sur des cultures primaires de trophoblastes issus de placenta de premier

trimestre et à terme, que la voie mTOR est activée par **l'insuline, l'IGF-1 et la leptine** (Jansson et al., 2003; Karl et al., 1992; Kniss et al., 1994). De manière intéressante, il a été montré que l'activité placentaire de mTOR est diminuée dans les grossesses présentant un retard de croissance intra-utérin (RCIU) (Roos et al., 2007). Des études réalisées *in vitro* sur des cultures primaires de trophoblastes humains, montrent que la voie mTOR exerce un effet positif sur l'activité du système A, sans changer l'expression des différentes isoformes. En effet, la voie mTOR semble augmenter le trafic à la membrane, notamment de l'isoforme SNAT2 (Roos et al., 2009b; Rosario et al., 2011). L'exposition à la rapamycine (un inhibiteur de la voie mTOR), diminue l'activité du système L et l'expression de l'ARNm de LAT1 suggérant que la voie mTOR active également le système L (Roos et al., 2007, 2009b).

Enfin, l'activité du **système local rénine-angiotensine** qui joue aussi un rôle important dans la circulation fœto-maternelle en permettant un flux sanguin adéquate pour l'oxygénation fœtale semble également réguler le transfert de nutriment (Nielsen et al., 2000). Il est intéressant de noter qu'une altération *in vitro* de la concentration en angiotensine II et des taux d'oxygène semblent affecter l'activité du système A dans le placenta humain (Nelson et al., 2003; Shibata et al., 2006).

4. Le transport des lipides

Les lipides sont des molécules organiques qui comprennent, les triglycérides (TG), les phospholipides (PL), les glycolipides, les sphingolipides, le cholestérol, les esters de cholestérol (CE). Ils sont constitués d'acides gras (AG) estérifiés par des alcools. Les AG sont également présents à l'état libres encore appelés AG non-estérifiés (NEFA). Dans la circulation sanguine, les phospholipides, le cholestérol, les CE et les TG se lient à des protéines pour former une grande variété de complexes lipoprotéiques tels que les chylomicrons, les high – low – intermediate and very low-density lipoproteines (HDL, LDL, IDL et VLDL, respectivement). Les NEFA se lient à l'albumine sérique.

Dans le placenta, les AG captés et transportés vers le fœtus sont originaires de deux sources prédominantes dans la circulation maternelle : les NEFA et les TG. Le fœtus est capable de

synthétiser quelques AG saturés et mono-insaturés à partir du glucose. Il est, en revanche, incapable de synthétiser suffisamment d'AG polyinsaturés à longue chaîne carbonées (LCPUFA) pour subvenir aux besoins fœtaux. Il est important de noter que des études réalisées *in vitro* sur cotylédons humains perfusés et *in vivo* chez l'Homme ont montré un transfert préférentiel des LCPUFA, dont l'acide docosahexaénoïque (DHA), du placenta vers le fœtus (Gil-Sánchez et al., 2011; Larqué et al., 2011).

a) *Hydrolyse des lipides*

Dans un premier temps, les lipides maternels sont rendus disponibles par une première étape d'hydrolyse des TG, du cholestérol ou des PL en NEFA. Cette étape enzymatique est accomplie par des lipases, associées à la MVM du ST. Le placenta exprime plusieurs lipases, dont deux principales : la **lipoprotéine lipase** (LPL) et la **lipase endothéliale** (EL) (Lindegard et al., 2006). L'expression de la LPL et de l'EL mesurée dans des explants placentaires est plus élevée dans le placenta à terme qu'au premier trimestre, suggérant une augmentation de l'activité de ces enzymes au cours de la grossesse (Gauster et al., 2017; Lindegard et al., 2006; Magnusson-Olsson et al., 2007). Les HDL, VLDL et LDL possèdent des récepteurs spécifiques exprimés dans la MVM du ST. Une fois reconnus par leurs récepteurs, ces complexes sont hydrolysés à la surface de la MVM en AG et glycérol. La LPL hydrolyse prioritairement les TG dans les particules de chylomicrons, les VLDL et les LDL. L'EL hydrolyse également les lipides présents dans les HDL, VLDL et LDL maternels.

L'activité de la LPL placentaire est modulée par des facteurs hormonaux et/ou nutritionnels. En effet, il est décrit que l'activité de la LPL est réduite après une exposition chronique au cortisol, à l'œstradiol (E2), à l'IGF-1 ou à l'insuline dans le placenta humain. En revanche, une exposition courte à l'œstradiol ou à l'insuline, en combinaison avec une hyperglycémie, augmente l'activité de la LPL dans le placenta humain (Magnusson-Olsson et al., 2007).

Par ailleurs, l'activité de la LPL mesurée sur des cultures de trophoblastes humains est réduite par les TG et NEFA eux-mêmes. Les mécanismes moléculaires impliqués dans ce contrôle ne

sont actuellement pas décrits (Magnusson-Olsson et al., 2007).

L'activité de la LPL est également régulée par les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et le TNF- α dans plusieurs tissus. Néanmoins, il a été montré qu'un traitement avec le TNF- α ou l'IL-6 ne modifie pas l'activité de la LPL sur des cultures d'explants placentaires ou de trophoblastes humains. Cependant, une corrélation négative entre les concentrations maternelles d'IL-6 et l'activité de la LPL, a été mise en évidence dans le placenta à terme (Lager et al., 2011; Magnusson-Olsson et al., 2007).

b) Les FATPs

A la suite de l'hydrolyse des lipides, les AG traversent la barrière placentaire selon le sens du gradient de concentration materno-fœtal. Les AG peuvent être métabolisés par le placenta pour son propre développement ou peuvent être transportés vers le fœtus. Les AG sont capables de traverser la membrane plasmique par simple diffusion. Néanmoins, dans les tissus à forte demande en AG, le transfert par simple diffusion n'est pas suffisant pour subvenir aux besoins. Les transporteurs d'AG (FATPs) sont des protéines exclusivement membranaires impliqués dans la captation des AG à longue chaîne carbonée (Kazantzis and Stahl, 2012). La famille des FATPs comprend six membres dont cinq sont exprimés dans le placenta humain, incluant FATP1-4 et 6 (*SLC27A1-4 et 6*). Les ARNm des FATP2, 4 et 6 sont les plus exprimés dans le placenta (Mishima et al., 2011). La protéine FATP1 a été localisée à la fois dans la MVM et la BM du ST. En revanche, la localisation subcellulaire des autres isoformes est encore peu décrite (Campbell et al., 1998). Les isoformes FATP1 et FATP4 semblent être les plus impliquées dans le transfert placentaire des AG. En effet, il a été démontré que les taux d'expression des ARNm de FATP1 et 4 dans le ST sont positivement corrélés aux taux de DHA dans le plasma maternel et dans le placenta humain. De plus, le taux d'expression de l'ARNm de FATP4 placentaire est également corrélé aux taux de DHA fœtal, suggérant que ce transporteur est particulièrement impliqué dans le transfert placentaire de LCPUFA (Larqué et al., 2006). Le rôle prépondérant de FATP4 dans le transport des AG a également été mis en évidence dans le modèle murin. En effet, une délétion de ce transporteur est associée à

une létalité embryonnaire (Gimeno et al., 2003).

Des études récentes se sont intéressées aux voies de signalisation impliquées dans le contrôle de l'expression des transporteurs FATP. Par exemple, l'activation de la voie de signalisation de l'hétérodimère PPAR γ /*retinoid X receptor* (RXR) stimule l'expression des ARNm de FATP1 et 4 et au contraire, diminue l'expression de l'ARNm de FATP2 dans le placenta humain. De même, l'inhibition de la voie p-38-MAPK freine la captation des AG par le ST et bloque l'augmentation de l'expression de FATP4 stimulée par la voie PPAR γ /RXR. En parallèle, l'inhibition de la voie p-38 MAPK augmente l'expression de FATP2 et 3, sans effet sur FATP1 (Schaiff et al., 2005). Dans le même modèle, il a également été décrit que l'exposition chronique à l'IL-6 diminue l'expression de l'ARNm de FATP4 sans modification de l'expression de la protéine FATP4 (Lager et al., 2011).

c) La FAT/CD36

La protéine translocase des acides gras (FAT/CD36) est une protéine transmembranaire fortement glycosylée. Elle est présente à la surface de nombreux types cellulaires tels que les trophoblastes, les plaquettes, les cellules endothéliales et les monocytes. La FAT/CD36 est connue pour être impliquée dans l'angiogenèse, l'athérosclérose, l'inflammation et le métabolisme des lipides. Il est bien décrit actuellement que cette translocase joue un rôle dans le transport facilité des AG dans le cœur et le muscle. Contrairement aux autres transporteurs d'AG, la FAT/CD36 est une protéine multifonctionnelle avec de nombreux ligands comprenant les AG à longue chaîne, le collagène, la thrombospondine et les LDL oxydés. Néanmoins, il semble que cette protéine présente également une grande affinité pour les HDL et VLDL. La présence de FAT/CD36 a été décrite dans la MVM et BM du ST à l'aide d'études réalisées *in vitro*, à la fois sur des trophoblastes humains isolés et sur extraits membranaires de ST. La littérature est peu abondante concernant la régulation des fonctions de la FAT/CD36 translocase dans le placenta. Il semblerait que la cavéoline-1 (composant des rafts lipidiques membranaires) contrôle la captation des AG en augmentant la disponibilité de la translocase à la surface membranaire du ST (Ring et al., 2006). Par ailleurs, il a été

démontré qu'un traitement avec la leptine de trophoblastes humains en culture augmente l'expression de la FAT/CD36 (Mousiolis et al., 2012).

d) *La p-FABPpm*

La protéine placentaire de liaison aux acides gras de la membrane plasmique (p-FABPpm) a été décrite dans le placenta humain et de brebis. Elle est située sur le feuillet externe de la MVM du ST (Campbell and Dutta-Roy, 1995). Sur plusieurs aspects, la p-FABPpm est différente de la FABPpm ubiquitaire, notamment par les acides aminés qui la compose ou son affinité de liaison pour les AG (Campbell et al., 1995). Plus précisément, la p-FABPpm montre une affinité élevée pour les LCPUFA, suggérant que ce transporteur est impliqué préférentiellement dans le transport placentaire de ces AG (Campbell et al., 1997). Des études de liaison directe réalisées *in vitro* ont mis en évidence que la p-FABPpm lie seulement 15 % des acides gras totaux, lorsque la protéine est incubée avec un mélange d'AG mimant la composition maternelle d'AG au terme de la grossesse. Parmi les AG liés, les auteurs retrouvent 98 % d'acide arachidonique (ARA) et 87 % de DHA (Campbell et al., 1998).

e) *Les FABPs*

Les protéines de liaison des acides gras (FABPs) sont localisées dans le cytoplasme du ST. Elles sont impliquées dans le trafic des AG vers des sites spécifiques tels que le réticulum endoplasmique, la mitochondrie, les gouttelettes lipidiques et les peroxysomes pour l'estérification, la β -oxydation ou le transfert vers le fœtus. Parmi les neuf isoformes de FABPs, seulement cinq ont été identifiées dans les trophoblastes humains : FABP1 (liver-FABP), FABP3 (heart-FABP), FABP4 (adipocyte-FABP), FABP5 (keratinocyte-FABP) et FABP7 (brain-FABP) (Cunningham and McDermott, 2009).

La présence et la régulation des protéines FABP1 et 3 ont été bien décrites dans les cellules trophoblastiques humaines (Campbell et al., 1998). Ces deux isoformes ont une grande affinité de liaison pour le DHA et l'ARA dans le placenta. L'équipe de Daoud et al. a montré une

augmentation de l'expression des ARNm de FABP1 et FABP3 de 3 à 5 fois, respectivement, lors de la différenciation des CT en ST humains (Daoud et al., 2005). De manière intéressante, il a été démontré que l'expression de FABP1 et 3 augmente sur des cultures primaires de CT en conditions hypoxique. L'analyse des éléments régulateurs de ces deux gènes révèle la présence d'un site potentiel de liaison du facteur de transcription HIF (Biron-Shental et al., 2007). Le complexe transcriptionnel PPAR γ /RXR participe également à la régulation de l'expression des FABPs. En particulier, l'expression de FABP1, spécifiquement, est induite par un traitement des trophoblastes par un agoniste de PPAR γ (GW1929). De même, une supplémentation en huile de poisson durant la seconde moitié de grossesse augmente l'expression placentaire de FABP1. Ces résultats suggèrent que les acides gras régulent l'expression de FABP1 dans le placenta humain (Schachtrup et al., 2004).

L'ARNm de FABP5 a été détecté dans le tissu placentaire humain mais la protéine correspondante n'a pas été mise en évidence. En revanche, la protéine FABP5 a été mise en évidence dans l'endothélium des capillaires fœtaux et dans les macrophages qui représentent 40 % de la population cellulaire dans le placenta (Masouyé et al., 1997). Les niveaux d'expression de FABP5 ne sont pas influencés par des conditions hypoxiques *in vitro*, malgré la présence d'éléments de réponse au HIF dans la région promotrice du gène (Biron-Shental et al., 2007).

L'expression et la localisation subcellulaire de la protéine FABP4 dans les cellules placentaires n'ont pas encore été décrites. En revanche, il a été démontré que comme FABP5, FABP4 est exprimé par les macrophages placentaires (Storch and McDermott, 2009). Il est possible que l'hypoxie contrôle l'expression de FABP4, bien qu'il n'ait pas été décrit d'effet direct. Cependant, un élément de réponse au facteur HIF dans la région régulatrice du gène FABP4 a été décrite (Biron-Shental et al., 2007).

Enfin, la littérature est contradictoire concernant l'expression du transporteur FABP7. D'une part, une étude a détecté la présence de l'ARNm de FABP7 par RT-qPCR dans le placenta humain (Larqué et al., 2006). Cependant, une seconde étude n'a pas mis en évidence l'ARNm de FABP7 sur CTV isolés (Biron-Shental et al., 2007). Des investigations complémentaires

sont donc nécessaires pour déterminer l'expression de l'ARNm mais aussi de la protéine FABP7 dans le placenta humain (**Figure 41**).

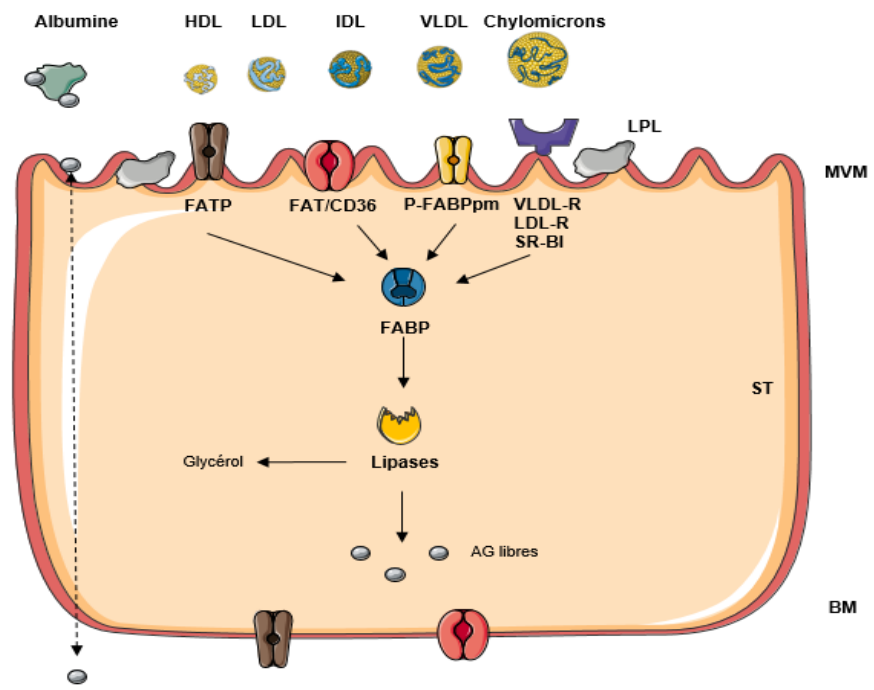


Figure 41 : Localisation des principaux transporteurs de lipides dans le syncytiotrophoblaste du placenta humain (D'après Evain-Brion, Malassiné, et Frydman 2010b)

Les AG libres peuvent pénétrer de manière passive dans le ST. Les lipoprotéines (HDL, LDL, IDL, VLDL et chylomicrons) se lient à des transporteurs spécifiques membranaires et sont hydrolysés en molécules plus simples par la LPL, avant d'entrer dans le ST. MVM : membrane microvillositaire ; BM : membrane basale ; ST : syncytiotrophoblaste

B. La fonction endocrine

Le placenta humain est un organe endocrine à part entière. Les hormones placentaires jouent un rôle essentiel dans l'établissement et le maintien de la grossesse, l'adaptation de l'organisme maternel à la grossesse, la croissance et le développement fœtal et dans la parturition. La majorité des hormones placentaires sont synthétisées et secrétées par le ST. Néanmoins, les autres types de trophoblastes peuvent aussi produire quelques hormones, en particulier les CTEV. Dans ce cas, les hormones et les facteurs de croissance participent directement à la régulation de la migration et de l'invasion trophoblastique dans l'endomètre

maternel (Ji et al., 2013; Lunghi et al., 2007).

Le passage des hormones placentaires dans la circulation maternelle fait l'objet d'intenses recherches en tant que biomarqueurs de pathologies de la grossesse. Néanmoins, pour des questions éthiques, les études *in vivo* chez l'espèce humaine sont limitées. C'est pourquoi de nombreuses recherches se portent sur des cultures *in vitro* d'explants placentaires humains ou de cellules trophoblastiques isolées. Alternativement, des cellules trophoblastiques humaines immortalisées, telles que les BeWo sont utilisées pour étudier la fonction endocrine placentaire.

Les facteurs endocrines, paracrines et/ou autocrines produits par le placenta humain incluent les hormones polypeptidiques, les stéroïdes et d'autres facteurs tels que les adipokines.

1. Les hormones polypeptidiques

a) *L'hormone chorionique gonadotrope*

L'hCG est le premier message émis par le trophoblaste pour prévenir l'organisme maternel de la grossesse. L'ARNm de l'hCG est détectable dès le stade six à huit cellules de l'embryon et sa sécrétion débute au 7^e jour après la fécondation, soit au moment de l'implantation (Bonduelle et al., 1988). L'hCG est détectable très tôt dans les urines maternelles ce qui permet de diagnostiquer précocement une grossesse (test de grossesse). Les concentrations maternelles circulantes augmentent progressivement pour atteindre un maximum à la dixième semaine de grossesse et diminuent très nettement au troisième mois pour rester pratiquement stationnaires jusqu'à l'accouchement (Nwabuobi et al., 2017).

L'hCG est une protéine hétérodimérique, formée de deux sous-unités : une sous-unité alpha, commune aux membres de la famille des hormones glycoprotéiques telles que l'hormone folliculo-stimulante (FSH), l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone thyroïdienne (TSH) et une sous-unité bêta spécifique de l'hCG (Policastro et al., 1986). La sous-unité alpha composée de 92 acides aminés, est codée par un seul gène situé sur le chromosome 6. Cette sous-unité alpha contient deux sites de N-glycosylation (Nwabuobi et al., 2017). La sous-unité bêta,

composée de 145 acides aminés, est codée par un cluster de gènes localisés sur le chromosome 19. La sous unité bêta possède deux sites de N-glycosylation et quatre sites de O-glycosylation (Fournier, 2016). Il est bien établi que le ST est la source principale d' hCG circulante. Cependant, il a été montré que les CTEV invasifs sécrètent également des quantités non négligeables d'hCG. L'hCG produite par ces CTEV présente une forme hyperglycosylée par comparaison avec l'hCG produite par le ST, appelée hCG-H. Très présente au début de la grossesse, la sécrétion d'hCG-H diminue tout au long du 1^{er} trimestre à la faveur de l'hCG secrétée par le ST.

La sécrétion d'hCG peut être modulée positivement par un grand nombre de facteurs hormonaux, dont la GnRH et la leptine ou négativement par la progestérone et l'inhibine, par exemple (Cameo et al., 2003; Islami et al., 2001; Petraglia et al., 1989; Szilágyi et al., 1993). De manière intéressante, le facteur de transcription PPAR γ favorise la sécrétion d'hCG par le ST mais inhibe sa production par les CTEV. La régulation de la sécrétion d'hCG s'effectue *via* diverses voies de signalisation, telles que l'AMPc-PKA, p38-MAPK et ERK1/2 et les src kinases (Daoud et al., 2005, 2006; Knöfler et al., 1999).

L'hCG partage les mêmes récepteurs que la LH (R-LH/ hCG) et qui est un récepteur couplé aux protéines G. Les cellules placentaires expriment deux types de récepteurs à l'hCG : une forme courte de 50 kDa exprimée dans le trophoblaste « jeune » et une forme longue de 80 kDa exprimée dans le trophoblaste à terme (Pidoux et al., 2007). Après liaison à son récepteur, l'hCG active majoritairement l'adénylate cyclase et en cascade stimule la protéine kinase A (PKA). De plus, par un mécanisme indépendant, l'hCG peut aussi activer la voie PLC-Inositol phosphate (IP) (Choi and Smitz, 2014).

L'hCG exerce des effets pléiotropes durant la grossesse par des actions autocrine et paracrine. Très précocement, l'hCG prend le relai de la LH hypophysaire et permet la transformation du corps jaune cyclique en corps jaune gravidique. Ce dernier assure la sécrétion de progestérone (P4) durant les six premières semaines de la grossesse. La sécrétion de P4 est primordiale pour le maintien de la grossesse précoce, jusqu'à ce que le placenta soit capable de produire la P4 lui-même (Garner and Armstrong, 1977).

Par ailleurs, l'hCG joue un rôle modulateur de l'angiogenèse endométriale et placentaire. Le récepteur de l'hCG a été mis en évidence dans les cellules endothéliales des artères utérines (Toth et al., 1994). Une étude réalisée *in vitro* montrent que l'hCG augmente la vasodilatation et diminue la production d'eicosanoïdes vasoconstricteurs dans les vaisseaux des artères utérines (Toth et al., 1994). De plus, en utilisant un modèle de culture en 3-dimensions composé de cellules endothéliales microvasculaires utérines, il a été démontré que l'hCG stimule la formation de capillaires et la migration des cellules endothéliales (Zygmunt et al., 2002). Enfin, d'autres études réalisées *in vitro* ont mis en évidence que l'hCG favorise la production de facteurs pro-angiogéniques tels que le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) par le CT et par les cellules épithéliales endométriales suggérant que l'hCG exerce un effet pro-angiogénique dans le placenta et dans l'endomètre (Berndt et al., 2006; Islami et al., 2003).

Des études ont démontré le rôle de l'hCG dans l'immunotolérance. En effet, un test de migration *in vitro* a mis en évidence que les CT produisant de l'hCG attirent les lymphocytes Treg, en favorisant l'augmentation de l'expression du récepteur de l'hCG à la surface des Treg, augmentant ainsi le nombre de Treg au site implantatoire. Ainsi, les Treg qui sont des cellules essentielles à la mise en place de l'immunotolérance, sont très nombreuses à l'interface fœto-maternelle (Schumacher et al., 2009). De plus, il a été démontré *in vitro* que l'hCG favorise la prolifération des cellules natural killer utérines (uNK) en culture. Ces cellules immunitaires sont également impliquées dans l'immunotolérance de la grossesse (Kane et al., 2009).

L'hCG participe également au contrôle du processus d'invasion trophoblastique. En effet, des co-cultures de CT humains issus de placentas de 1^{er} trimestre et de cellules stromales déciduales (ESC) exposées à l'hCG montrent une augmentation de la sécrétion des métalloprotéases (MMP-2 et MMP-9) par les CT et une diminution des taux de leurs inhibiteurs spécifiques (TIMP1, 2 et 3) dans les ESC (Fluhr et al., 2008). Ces résultats suggèrent que l'hCG favorise l'implantation embryonnaire en exerçant un double contrôle sur les deux principaux types cellulaires à l'interface fœto-maternelle.

Enfin, l'hCG, joue un rôle essentiel dans la différenciation du CT en ST. En effet, sur des

cultures de CTV traités par des concentrations croissantes en hCG, les résultats ont montré que l'hCG favorise l'agrégation des CT et l'expression de marqueurs de différenciation cellulaire tels que l'hPL et SP1. Les effets de l'hCG sont dépendants du temps et de la dose. Cette étude a également mis en évidence, par l'utilisation d'un inhibiteur de la PKA (H-89), une diminution de la réponse à l'hCG, suggérant l'implication de la voie PKA dans les effets différenciant de l'hCG (Shi et al., 1993).

Ainsi, l'hCG est une hormone complexe dont la synthèse quantitative et qualitative (glycosylation) varie selon le site de production trophoblastique (CTV ou CTEV) et l'évolution de la grossesse (Evain-Brion et al., 2010b).

b) L'hormone lactogène placentaire (hPL)

L'hPL, aussi connue sous le nom d'hormone chorionique somatotrope (hCS) est un polypeptide codé par un cluster de cinq gènes localisés sur le chromosome 17. Parmi les cinq gènes, trois codent pour l'hPL (*HPL-A*, *HPL-B* et *HPL-L*). Seulement les formes HPL-A et B sont retrouvées dans la circulation maternelle. Cette hormone est également retrouvée en très faible quantité dans le sang fœtal. Jusqu'à la fin de la grossesse, les niveaux d'hPL maternels augmentent considérablement et diminuent jusqu'à une disparition après la délivrance du placenta (Handwerger and Freemark, 2000). L'équipe de Sciarra et al, a démontré que le taux d'hPL reflète l'évolution de la masse placentaire au cours de la grossesse et plus précisément celle du ST, lieu de sa synthèse (Sciarra et al., 1968). L'hPL agirait en se liant au récepteur de l'hormone de croissance hypophysaire (GH) avec une plus faible affinité que son ligand principal. Elle est aussi capable de se lier au récepteur de la prolactine (Handwerger and Freemark, 2000). La sécrétion d'hPL est régulée par différents médiateurs tels que l'AMPc, la GnRH ou l'insuline (Harman et al., 1987; Hochberg et al., 1983, 1988).

Le rôle physiologique de l'hPL est encore mal élucidé. Cependant, sa fonction principale est la préparation de l'organisme maternel à la lactation. En effet, l'hPL, induit la prolifération et la différenciation des cellules de la glande mammaire. Elle semble aussi être impliquée dans la régulation du métabolisme maternel des lipides et des carbohydrates. En effet, l'hPL favorise

la lipolyse augmentant ainsi les AG libres circulants (Handwerger and Freemark, 2000). Il semblerait également que l'hPL augmente la fonction des îlots pancréatiques en culture primaire et la sécrétion d'insuline maternelle (Brelje et al., 1993). D'autre part, des études menées *in vitro* ont montré également des effets de l'hPL chez le fœtus. Il semblerait que l'hPL stimule la croissance et la synthèse d'IGF-1 dans les hépatocytes, les myoblastes et les fibroblastes fœtaux (Hill et al., 1985; Strain et al., 1987).

Enfin, l'équipe de Coxa et al. a montré que cette hormone inhibe la production de leptine dans le ST en culture primaire suggérant un rôle pro-différenciant de cette hormone (Coxa et al., 2006).

c) *L'hormone de croissance placentaire (hPGH)*

L'hPGH est le produit du gène *GH-V* exprimé spécifiquement dans le placenta. Il existe deux transcrits de ce gène. Le transcrit *GH-V2* est traduit en une protéine membranaire et le transcrit majeur est traduit en une protéine sécrétée, l'hPGH. Cette hormone se distingue de l'hormone de croissance hypophysaire par 13 acides aminés. L'hPGH est majoritairement synthétisée par le ST de manière non pulsatile. Cependant, les CTEV semblent aussi être capables de produire l'hPGH. Cette sécrétion stimule, de manière autocrine, les capacités invasives des CTEV (Alsat et al., 1998; Lacroix et al., 2005). Cette hormone est détectée dans la circulation maternelle à partir de 15-20 jours de grossesse et ses taux augmentent fortement durant le troisième trimestre. Elle remplace progressivement la GH maternelle qui devient indétectable dans la circulation à cours du deuxième trimestre de grossesse. Néanmoins, comparée à l'hPL, les taux d'hPGH sont plus faibles. De plus, l'hPGH n'est pas libérée dans la circulation fœtale (Alsat et al., 1998).

L'hPGH se fixe sur le récepteur de l'hormone de croissance hypophysaire et possède aussi une affinité pour le récepteur de la prolactine. De cette manière, l'hPGH « partage » les mêmes récepteurs que l'hPL, qui sont exprimés dans le placenta (Alsat et al., 1998; Frankenne et al., 1992; Lowman et al., 1991).

La régulation de la production de l'hPGH se réalise *via* certains facteurs identiques à ceux

impliqués dans la modulation de l'hPL tels que l'AMPc et l'insuline (Alsat et al., 1998). Il semblerait que cette hormone soit aussi sensible à la glycémie puisqu'il a été montré *in vitro* que la sécrétion d'hPGH est inhibée par le glucose dans des explants placentaires et dans des cellules trophoblastiques en culture. A l'inverse, lors d'une hypoglycémie, les taux d'hPGH augmentent. Cette régulation dépendante de la glycémie pourrait permettre de maintenir un apport énergétique adapté à la demande du fœtus (Björklund et al., 1998).

Durant la grossesse, l'hPGH assure des fonctions identiques à celles de l'hormone de croissance. En effet, l'hPGH stimule la synthèse d'IGF-1 maternelle dont les taux sont corrélés à ceux de l'hPGH au cours de la grossesse (Alsat et al., 1998; Caufriez et al., 1993). Cette hormone est importante, tout comme l'hPL, dans le métabolisme énergétique. L'hPGH participe à l'induction de l'insulino-résistance maternelle en favorisant la néoglucogenèse, la lipolyse ou l'anabolisme augmentant ainsi la disponibilité des nutriments pour le fœtus (Alsat et al., 1998). Enfin, elle exerce des effets autocrines en stimulant l'invasion des CTEV *in vitro* par l'activation de la voie Janus kinase 2/signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) (Lacroix et al., 2005).

d) *Protéine A plasmatique associée à la grossesse (PAPP-A)*

PAPP-A, aussi nommée pappalysine-1, est une métalloprotéine appartenant à la famille des pappalysine (de la superfamille des metzincines) identifiée dans le plasma de femmes enceintes (Lin et al., 1974). Elle est codée par le gène *PAPPA* situé sur le chromosome 9. Elle est majoritairement synthétisée par les CT, le ST et les CTEV (Guibourdenche et al., 2003; Handschuh et al., 2006). Les taux de PAPP-A augmentent tout au long de la grossesse et chutent après la délivrance (Leguy et al., 2014; Sutcliffe et al., 1982). Très peu de données sont connues concernant les facteurs régulant l'expression de cette protéine. Il a été décrit que la progestérone serait impliquée dans l'augmentation de l'expression de PAPP-A, *via* l'activation potentielle de la voie p38- et ERK1/2-MAPK (Costa, 2016; Wang et al., 2014). En revanche, l'activation du facteur PPAR γ inhibe son expression dans les CTEV spécifiquement (Handschuh et al., 2006).

De même, le rôle de PAPP-A n'est pas encore clairement établi. Il a été mis en évidence que cette hormone clive spécifiquement l'IGFBP-4 et dans une moindre mesure l'IGFBP-2 et l'IGFBP-5 (Kumar et al., 2005; Lawrence et al., 1999). Par cette action, elle diminue l'affinité de l'IGFBP-4 pour IGF-1 et 2. PAPP-A favorise ainsi les interactions et l'activation du récepteur à ses ligands IGF-1 et 2. Cette action de la PAPP-A pourrait conduire à une modulation du métabolisme du glucose, de la prolifération cellulaire, de la différenciation, de l'invasion et de la survie cellulaire (Oxvig, 2015). En effet, il a été mis en évidence que la PAPP-A favorise *in vitro*, i) la prolifération et ii) l'adhésion à des cellules épithéliales utérines, des cellules de la lignée trophoblastique JAR suggérant un rôle de cette protéine dans l'implantation embryonnaire (Wang et al., 2014).

e) *La protéine placentaire 13 (PP13)*

PP13 ou galectine-13, est une protéine membre de la superfamille des galectines, codée par le gène *LGALS13*, située sur le chromosome 19. PP13 est un homomère constitué de deux sous-unités reliées par des ponts disulfures. Cette protéine possède la capacité de lier des résidus β -galactose de certaines protéines cellulaires et de la matrice extracellulaire (Than et al., 2004). Elle est principalement synthétisée par le ST et est libérée dans la circulation maternelle. Deux études ont mis en évidence une expression de la PP13 dans l'endothélium des vaisseaux fœtaux (Sekizawa et al., 2009; Than et al., 2004). Les taux de PP13 augmentent doucement au cours de la grossesse, particulièrement au troisième trimestre et chute après l'accouchement (Huppertz et al., 2008). La régulation de l'expression de ce facteur est encore très peu étudiée. Néanmoins, il a été décrit que sa libération dans la circulation maternelle est favorisée par un influx de calcium (Burger et al., 2004). De plus, l'activation des voies p38-MAPK et PKA activent la transcription du gène *LGALS13* (Costa, 2016; Orendi et al., 2010). Le rôle de PP13 au cours de la grossesse n'est pas encore clairement établi. Il semblerait que PP13 soit impliquée dans l'immunotolérance par induction de l'apoptose de cellules immunitaires (Than et al., 2004). De plus, des études immunohistochimiques sur des placentas de 1er trimestre ont montré que PP13 forme des agrégats proches des veines de la

décidue induisant ainsi la formation de zones de nécrose déciduales (ZONE). Ainsi, ces « ZONE » contiennent des lymphocytes T activés, des neutrophiles et des macrophages. L'hypothèse émise est que ces cellules activées pourraient détourner les cellules immunitaires maternelles loin des artères spiralées pour permettre l'invasion des trophoblastes et le remodelage des vaisseaux (Kliman et al., 2012). Enfin, il a été démontré chez les rongeurs, que PP13 exerce un effet vasodilatateur en favorisant la sécrétion de prostaglandines vasoactives. Ces derniers résultats suggèrent que PP13 pourrait moduler la pression sanguine utéroplacentaire (Huppertz et al., 2013).

f) Les inhibines et les activines

Ces hormones sont des glycoprotéines dimériques reliées entre elles par des ponts disulfures. Elles appartiennent à la superfamille des facteurs TGF- β . L'inhibine est un hétérodimère composé d'une sous-unité α et β . L'activine est un homodimère de sous-unités β . Chez l'Homme, une sous-unité α et quatre isoformes de la sous-unité β ont été identifiées (β_A , β_B , β_C , β_E). Actuellement, deux inhibines, l'inhibine A ($\alpha\beta_A$) et l'inhibine B ($\alpha\beta_B$) et trois activines, l'activine A ($\beta_A\beta_A$), l'activine B ($\beta_B\beta_B$) et l'activine AB ($\beta_A\beta_B$), sont aussi bien caractérisées (de Kretser et al., 2002; Walton et al., 2012). Ces hormones sont exprimées dans plusieurs tissus et organes, incluant les organes reproducteurs, le cerveau, le pancréas et le placenta. Les inhibines A et B et l'activine A sont exprimées majoritairement dans le ST et dans une moindre mesure dans le CT. En revanche, les données de la littérature concernant l'expression des activines B et AB dans le placenta sont encore controversées (McCluggage et al., 1998; Petraglia, 1997). Au cours de la grossesse, les taux sériques d'inhibine A et B et d'activine A augmentent et ceux de l'activine AB sont indétectables (Fowler et al., 1998).

Dans le placenta, la régulation de la sécrétion des activines et des inhibines est modulée par de nombreux facteurs. Il est bien décrit que l'hCG, l'EGF, les prostaglandines et l'AMPc stimulent la sécrétion de l'inhibine A (Li et al., 1994; Qu and Thomas, 1993). En contrepartie, l'activine A et l'hypoxie freine la production de l'inhibine A (Manuelpillai et al., 2003; Qu and Thomas, 1993).

Les effets des activines sont médiés par l'activation de leurs récepteurs spécifiques, ActRIIA et ActRIIB. Il s'agit de récepteurs membranaires à activité serine/thréonine kinase de type II. La liaison de la protéine à ses récepteurs spécifiques entraîne la phosphorylation de récepteurs de type I (*activin receptor-like kinase*) appelés ALK4, ALK5 et ALK7. Ces derniers activent par phosphorylation des messagers secondaires, les protéines smad-2 et la smad-3. Ces protéines sont transloquées dans le noyau pour moduler la transcription de gènes cibles. Par ailleurs, les activines sont capables de stimuler d'autres voies de signalisation telles que les voies MAPK, Akt/PI3K et Wnt/ β -caténine (Tsuchida et al., 2009; Walton et al., 2012). L'ensemble de ces récepteurs de type I et II sont exprimés dans le placenta, et plus particulièrement dans le ST (Schneider-Kolsky et al., 2002). En agissant sur ses récepteurs, les activines jouent plusieurs rôles au cours de la grossesse. En effet, il a été démontré que les activines favorisent *in vitro* la syncytialisation des CT isolés à partir de placenta humain (Gerbaud et al., 2011; Song et al., 1996). D'autre part, les activines stimulent la fonction endocrine du ST en augmentant les sécrétions d'hCG, de progestérone, de GnRH et l'activité de l'aromatase (Song et al., 1996; Steele et al., 1993). De plus, les activines favorisent également la différenciation *in vitro*, des CT en CTEV en stimulant l'expression des MMP-2 et MMP-9 (Jones et al., 2006). L'activine A stimule la production de pro-MMP-2, 3, 7, 9 et de la MMP-2 active par les ESC et les cellules endothéliales endométriales (EEC) humaines. Enfin, l'activine A exerce un effet positif sur la décidualisation des cellules endométriales humaines *in vitro*, suggérant que cette hormone régule la réceptivité utérine (Jones et al., 2002, 2006).

2. Les hormones stéroïdes

a) La progestérone (P4)

La P4 est une hormone stéroïde cruciale pour le maintien de la gestation. Elle est aussi appelée « hormone de la grossesse ». Durant les six premières semaines de grossesse, la production de P4 est essentiellement assurée par le corps jaune gravidique. Après six à huit semaines et jusqu'à la fin de la grossesse, le placenta devient graduellement le producteur

majeur de P4 (Tuckey, 2005). Les taux de P4 maternels augmentent donc progressivement au cours de la grossesse, avec un pic durant les quatre dernières semaines et une chute après l'accouchement (Csapo et al., 1971). Cette hormone stéroïde est principalement synthétisée à partir du cholestérol maternel véhiculé par les lipoprotéines maternelles telles que les LDL. Une fois internalisées dans le ST, après liaison au récepteur des LDL, les LDL sont dirigées vers les lysosomes et le cholestérol ainsi libéré sera utilisé pour la stéroïdogénèse et la biosynthèse des membranes cellulaires placentaires. D'autre part, ce processus d'internalisation peut aussi impliquer le récepteur *scavenger receptor* B1 (SR-B1), également présent sur la MVM du ST. Le SR-B1 lie avec une forte affinité de multiples ligands, incluant les HDL, LDL et VLDL. Ainsi, les esters de cholestérol sont capturés par le ST sans internalisation ni dégradation des lipoprotéines. Le cholestérol libre est alors transporté par la *sterol carrier protein-2* (SCP-2) à la membrane externe de la mitochondrie. Néanmoins, il est important de noter qu'à l'inverse des autres organes stéroïdogéniques, le placenta n'exprime pas la protéine *steroidogenic acute regulatory protein* (stAR), responsable du transfert du cholestérol depuis la membrane externe de la mitochondrie jusqu'à la membrane interne (Sugawara et al., 1995). En contrepartie, le ST synthétise une protéine spécifique endosomale assurant ce transfert, la *metastatic lymph node 64* (MLN64) (Watari et al., 1997). Dans la membrane interne de la mitochondrie, le cholestérol est transformé en prégnénolone par le cytochrome p450 de clivage de la chaîne latérale du cholestérol (CYP450sc). La prégnénolone est par la suite convertie en P4 par l'action de l'enzyme 3 β -hydroxystéroïde-deshydrogénase/isomérase (3 β -HSD). Cette synthèse de P4 par le placenta est contrôlée par de nombreux facteurs. Des facteurs hormonaux tels que l'œstradiol et l'IGF-1 sont décrits comme des facteurs activateurs de la synthèse de P4 et d'autres tels que la leptine et la CRH contrôlent négativement la synthèse de P4 (Cameo et al., 2003; Gao et al., 2012; Nestler, 1989; Shanker and Rao, 1997).

Certaines voies de signalisation intracellulaires sont spécifiquement impliquées dans le contrôle de la synthèse de P4. En particulier, la PKA stimule la synthèse de tous les stéroïdes en favorisant le transport du cholestérol dans la mitochondrie (Gomez-Chang et al., 2014). De

plus, l'activation des voies p38- et ERK1/2-MAPK augmente la transcription de l'enzyme 3 β -HSD (Costa, 2016).

La P4 exerce des effets génomiques en se liant à ses récepteurs cytosoliques PR α et PR β . Ces 2 récepteurs forment des dimères après la liaison de la P4 puis sont transloqués dans le noyau pour se lier à des éléments de réponse spécifiques situés sur le promoteur de gènes cibles. La P4 exerce également des effets non génomiques médiés par des récepteurs membranaires nommés *membrane progestin receptors* dont on distingue trois isoformes : mPR α , mPR β et mPR γ . Ces récepteurs s'apparentent aux récepteurs couplés aux protéines G et sont capables d'activer les mêmes voies de signalisation. Ils ont été décrits dans divers tissus chez l'Homme, tels que l'endomètre, le myomètre, le chorion mais aucune donnée n'a encore montré leur présence dans le placenta (Dressing et al., 2011).

Au cours de la grossesse, la progestérone joue un rôle fondamental dans la mise en place de la réceptivité utérine. En effet, il a été montré *in vitro* que la P4 stimule la décidualisation des ESC *via* l'activation de la voie de signalisation PKA (Brar et al., 1997). Dans les modèles animaux, cette hormone favorise aussi l'implantation embryonnaire, d'une part en bloquant l'effet prolifératif des œstrogènes sur l'épithélium endométrial maternel et d'autre part en augmentant l'expression de gènes impliqués dans la réceptivité utérine. Par ailleurs, la P4 favorise l'attachement et l'implantation de l'embryon à l'endomètre (Halasz and Szekeres-Bartho, 2013). Pour des raisons éthiques, le rôle de la P4 dans l'implantation embryonnaire chez l'Homme est encore peu étudié. De plus, la P4 participe à l'immunotolérance en stimulant la production de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-4 et en inhibant les cytokines pro-inflammatoires telles que l'INF- γ et le TNF- α synthétisées par les lymphocytes T-helper (Raghupathy et al., 2005).

Dans le placenta, des études menées *in vitro* ont montré que la P4 inhibe la fonction endocrine de cet organe, en réduisant la production d'hCG, de leptine et de résistine (Coya et al., 2005; Lappas et al., 2005; Szilágyi et al., 1993). La P4 freine également l'invasion trophoblastique *in vitro*, en diminuant l'expression des MMP-2 et MMP-9 dans les ESC et les CTEV et en favorisant l'expression de TIMP-3 dans les ESC (Chen et al., 2011; Higuchi et al., 1995; Zhang

et al., 2000).

b) Les œstrogènes

Les œstrogènes se présentent sous 4 formes différentes : l'œstrone (E1), le 17 β -œstradiol (E2), l'œstriol (E3) et l'oestétrol (E4). Durant les premières semaines de la grossesse, les œstrogènes sont produits par le corps jaune gravidique et sont ensuite synthétisés par le placenta tout au long de la grossesse. La synthèse des œstrogènes placentaires reflète directement l'interdépendance entre la mère, le fœtus et le placenta. En effet, comparé aux autres organes de la stéroïdogénèse, le placenta n'exprime pas l'enzyme 17 α -hydroxylase/17-20-lyase, responsable de la conversion de la prégnénolone et progestérone en androgènes. Or les androgènes sont eux même transformés par aromatisation en œstrogènes. La production placentaire humaine d'œstrogènes est tributaire d'un précurseur des androgènes, le sulfate de déhydroépiandrosterone (DHEAS), produit par les surrénales maternelles et fœtales et convertit en androstènedione et testostérone. Dans le ST, l'enzyme cytochrome P450 (CYP450) aromatase convertit ces précurseurs androgéniques en E1 et E2 (Levitz and Young, 1978). La synthèse des œstrogènes issue de l'activité de la surrénale fœtale augmente progressivement au cours de la grossesse. A terme, la surrénale fœtale assure 40 % de la production en E1 et E2 et 90 % de la production d'E3. Le DHEAS traverse, par simple diffusion, la membrane du ST et est hydrolysé en DHEA libre par une stéroïde sulfatase. Puis le DHEA est transformé en androstènedione par la 3 β -HSD, lui-même métabolisé en testostérone par la 17 β -HSD. Enfin, ces androgènes sont aromatisés en œstrogènes par le CYP450 aromatase.

La biosynthèse des œstrogènes est régulée par divers mécanismes tels que la disponibilité du substrat, l'expression et l'activité des enzymes impliquées dans leur synthèse. Par exemple, l'hCG stimule l'activité de l'aromatase (Lobo and Bellino, 1989). En revanche, l'insuline et la leptine inhibent la synthèse d'œstradiol (Coya et al., 2006; Hochberg et al., 1988).

Les œstrogènes exercent classiquement leurs effets *via* des récepteurs spécifiques nucléaires

RE α et RE β . De la même manière que pour la P4, ces récepteurs forment un dimère après la liaison du ligand qui module l'expression de gènes œstrogéno-dépendants. Ces hormones peuvent aussi activer des récepteurs aux œstrogènes associés à la membrane et exerçant des effets non génomiques conduisant à la mobilisation du calcium intracellulaire et à l'activation de l'adénylate cyclase (Björnström and Sjöberg, 2005).

Dans le placenta, le récepteur RE α est exprimé en grande majorité dans les CT et le récepteur RE β est exprimé particulièrement dans le ST (Bechi et al., 2006).

L'E2 est l'œstrogène le plus abondant au cours de la grossesse et plusieurs rôles lui sont attribués. D'une part, l'E2 favorise l'implantation embryonnaire en stimulant la croissance et la différenciation des cellules endométriales (Groothuis et al., 2007). D'autre part, l'E2 favorise l'angiogenèse et la vasodilatation dans l'endomètre maternel, suggérant que l'E2 joue un rôle important dans la régulation du flux sanguin utéroplacentaire. En effet, une étude récente réalisée *in vitro* démontre que l'E2 favorise la prolifération et la migration des cellules *human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC) *via* ses récepteurs nucléaires et en activant la voie de signalisation RhoA-ROCK. Cette cascade de signalisation conduit à l'activation de l'expression de protéines impliquées dans le cycle cellulaire (Oviedo et al., 2011).

Dans les trophoblastes, le rôle de l'E2 n'est pas encore clairement établi. L'E2 favoriserait la syncytialisation des trophoblastes *in vitro via* son récepteur RE α (Bukovsky et al., 2003).

L'E2 stimule également la production de la leptine dans la lignée cellulaire BeWo, par des actions génomiques et non génomiques impliquant des cross-talk entre les voies RE α , ERK1/2 et PI3K/Akt (Gambino et al., 2010). Enfin, l'œstradiol inhibe la libération de la résistine dans des explants placentaires (Lappas et al., 2005).

3. Les adipokines

Le placenta est un organe endocrine à part entière, capable de synthétiser une grande variété d'hormones, comprenant les adipokines.

La résistine a été mis en évidence dans le placenta en 2003. Elle est exprimée dans le ST et

les CTEV en début de gestation et dans le ST en fin de gestation (Yura et al., 2003). Une seule étude s'est intéressée au rôle de la résistine dans le placenta humain. Cette étude montre que la résistine stimule l'entrée de glucose en augmentant l'expression du transporteur GLUT1 *via* la voie des MAPK, suggérant une implication de cette adipokine dans le contrôle du passage de nutriment vers le fœtus (Di Simone et al., 2006).

La chémérine est aussi exprimée dans le placenta humain et de rat. Plus précisément, la chémérine est présente dans les cellules stromales endométriales et les CTEV. La chémérine semble jouer un rôle dans la placentation grâce à ses propriétés chimioattractantes. En effet, il a été montré que la chémérine régule i) l'accumulation de cellules NK à l'interface fœto-maternelle et ii) le remodelage vasculaire au début de la grossesse (Carlino et al., 2012; Kasher-Meron et al., 2014).

L'apéline est également exprimée dans le placenta humain où elle semble contrôler l'homéostasie glucidique fœtale (Mayeur et al., 2016). Enfin, l'apéline stimule le transport des acides aminés dans le placenta humain (Vaughan et al., 2019).

Dans la suite de cette partie, seules les adipokines les mieux décrites dans le placenta (leptine et adiponectine) seront détaillées.

a) La leptine

De la même manière que le tissu adipeux (TA), le placenta est un puissant organe endocrinien capable d'exprimer et de sécréter la leptine. La leptine placentaire humaine est identique à celle dérivée du TA en termes de taille, de charge et d'immunoréactivité (Lappas et al., 2005). Cependant, la région promotrice du gène possède un « enhancer » spécifique, connu pour être une région activatrice de la synthèse de la leptine placentaire (Ebihara et al., 1997). En effet, il a été montré que l'expression de la leptine placentaire est stimulée par les hormones de la grossesse, telles que la β -hCG, l'œstrogène, la progestérone et l'hPL. De plus, le statut hypoxique, l'insuline, les glucocorticoïdes, plusieurs interleukines (IL-1 α , IL-1 β , IL-6) et l'IFN- γ régulent l'expression de la leptine placentaire (Bischof and Campana, 2000; Costa, 2016; Coya et al., 2005; Fontana et al., 2010a, 2010b; Pérez-Pérez et al., 2013).

Il a été démontré que la leptine et ses récepteurs spécifiques LEPR (les formes courtes, longues et la forme soluble) sont précisément localisés dans le ST du placenta humain (Challier et al., 2003). De plus, il a été rapporté que la leptine est capable de stimuler les voies JAK/STAT, MAPK, et PI3K, à la fois dans les cultures de cellules trophoblastiques humaines JEG-3 et dans le placenta humain à terme (Allison and Myers, 2014; Peelman et al., 2014; Pérez-Pérez et al., 2008).

➤ Leptine et prolifération/apoptose trophoblastique

Diverses études *in vitro* ont démontré l'importance du rôle de la leptine dans le développement du placenta. En effet, la leptine stimule la prolifération des cellules trophoblastiques (Maymó et al., 2011). Plus précisément, la leptine favorise la prolifération cellulaire de manière dose- et temps-dépendant en stimulant la progression du cycle cellulaire vers une phase G2/M et en induisant l'expression de régulateurs de la transition G1/S, telle que la cycline D1 (Magariños et al., 2007). Cet effet mitogène est associé à l'activation des voies de signalisation JAK-STAT, MAPK et PI3K (Martín-Romero et al., 2000; Pérez-Pérez et al., 2008, 2010).

En parallèle, la leptine exerce des effets anti-apoptotiques dans les cellules trophoblastiques qui semblent médiés principalement par la voie MAPK (Magariños et al., 2007; Pérez-Pérez et al., 2008, 2016). Une étude récente réalisée à la fois dans les cellules trophoblastiques de la lignée Swan-71 et dans des explants de placenta humains à terme, montre que l'exposition à la leptine inhibe les événements précoces (le clivage de la caspase-3) et tardifs (le clivage de la poly ADP-ribose polymérase) de la voie apoptotique. De plus, la leptine contrôle la voie apoptotique en diminuant à la fois l'expression et le niveau d'activation de la protéine p53 dans les cellules placentaires (Toro et al., 2014).

➤ Leptine et différenciation trophoblastique

La leptine joue également un rôle central dans la régulation de la différenciation biochimique, et morphologique des trophoblastes. En effet, il a été démontré que la leptine stimule la capacité des CTV humains (isolés du placenta à terme) et des cellules de la lignée BeWo à

se différencier en ST (Ge et al., 2011). Ces effets sont médiés par les voies de signalisation PKA et p38-MAPK. De plus, la leptine contrôle positivement la différenciation trophoblastique en régulant la synthèse d'hCG. Une boucle auto-régulatrice positive s'établit ainsi dans le ST (Islami et al., 2003; Michalakis et al., 2013).

➤ Leptine et invasion trophoblastique

Diverses études rapportent que la leptine favorise l'invasion des trophoblastes dans l'endomètre. Cet effet pro-invasif de la leptine est associé à une modulation de l'expression des intégrines conférant un phénotype invasif aux trophoblastes. En effet, la leptine *in vitro* régule positivement l'expression de l'intégrine $\alpha 5\text{-}\beta 1$ dans les trophoblastes issus de placenta de 1^{er} trimestre. De plus, la leptine régule l'expression de l'intégrine $\alpha 6\text{-}\beta 4$ dans 80 % des cellules cultivées *in vitro*. Enfin, la leptine participe au contrôle de l'invasion trophoblastique en augmentant l'activité de la métalloprotéase MMP-9 spécifiquement (Castellucci et al., 2000).

➤ Leptine et angiogenèse placentaire

La leptine placentaire participe également au contrôle de l'angiogenèse. En effet, la leptine stimule l'angiogenèse placentaire en augmentant l'expression du facteur pro-angiogénique VEGF et de son récepteur VEGF-R2 dans les trophoblastes humains en culture. Une fois activé, le récepteur VEGF-R2 stimule les voies p38-MAPK et PKA induisant une néovascularisation (Sierra-Honigmann et al., 1998). De plus, la leptine participe au remodelage vasculaire de la décidue maternelle en activant les cellules uNK. En effet, il est bien décrit que ces cellules uNK produisent un ensemble de facteurs angiogéniques, notamment l'angiopoïétine-1 (Ang-1), l'Ang-2 et le VEGF-C (Lash et al., 2010).

➤ Leptine et transport placentaire des nutriments

La leptine joue un rôle important dans le transport des nutriments en général et des acides aminés en particulier. Il a été clairement montré, *in vitro*, que la leptine stimule l'activité des transporteurs du système A dans des explants placentaires. Ses effets semblent être médiés

par l'activation de la voie JAK-STAT. En effet, l'inhibition spécifique de la voie JAK-STAT conduit à une réduction de l'activité des transporteurs du système A, mesurée par le passage de l'analogue des acides aminés MeAIB (Jansson et al., 2003; von Versen-Höyneck et al., 2009b).

➤ Leptine et immunité placentaire

Une étude récente a révélé que la leptine, *in vitro*, participe à l'immunité innée et adaptative des cellules trophoblastiques. Plus précisément, il a été démontré que la leptine induit l'expression de l'HLA-G par le trophoblaste en activant les cascades de signalisation MAPK et PI3K (Barrientos et al., 2015). Compte tenu des propriétés immunosuppressives bien connues de HLA-G (**voir paragraphe C, ci-dessous**), les chercheurs ont estimé que la leptine placentaire est un facteur protecteur qui confère aux trophoblastes un phénotype tolérogène vis à vis des tissus maternels au cours des premiers stades de grossesse.

b) *L'adiponectine*

➤ Adiponectine et prolifération/apoptose trophoblastique

L'adiponectine semble jouer un rôle important dans la croissance placentaire. De plus, dans le placenta de premier trimestre, il a clairement été démontré que l'adiponectine, *in vitro*, exerce une action antiproliférative dans les cellules trophoblastiques (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, *via* l'activation de la voie des MAPK (Chen et al., 2014). De plus l'adiponectine présente des effets pro-apoptotiques dans les cellules trophoblastiques issues de placenta de 1er trimestre. Ces effets sont associés i) à une inhibition de la biogenèse et de la fonction mitochondriale et ii) à une surexpression des protéines Bcl-2-associated X (BAX) et p53 (Duval et al., 2016).

➤ Adiponectine et différenciation trophoblastique

Des études réalisées *in vitro* montrent que l'adiponectine stimule la différenciation biochimique

(augmentation de sécrétion hormonale d'hCG et de leptine) et morphologique (expression accrue de syncytine 2 et diminuée d'E-cadhérine) *via* l'activation de la voie PKA dans les cellules BeWo et les trophoblastes isolés à partir de placentas de 1^{er} trimestre précoces (obtenus avant arrivée du sang maternel dans la chambre intervillieuse) (Benaitreau et al., 2010a). En revanche, l'adiponectine inhibe la différenciation biochimique des trophoblastes villosités issus de placenta de 1^{er} trimestre tardif et de 3^{ème} trimestre (diminution de la sécrétion d'hCG, de l'hPL et de la P450-aromatase). Cependant, l'adiponectine n'a pas d'effet sur la différenciation morphologique des trophoblastes issus de placenta à terme (Benaitreau et al., 2010a; McDonald and Wolfe, 2009). Ces observations suggèrent que l'adiponectine exerce des effets dépendant de l'âge gestationnel dans le placenta humain.

➤ Adiponectine et invasion trophoblastique

Dans le placenta humain du 1^{er} trimestre, il a été clairement démontré que l'adiponectine favorise le caractère invasif des cellules trophoblastiques extravillieuses en stimulant l'activité des métalloprotéases telles que MMP-2 et MMP-9. En parallèle, l'adiponectine diminue l'expression de l'inhibiteur de ces enzymes, le facteur TIMP-2 (Benaitreau et al., 2010b).

➤ Adiponectine et angiogenèse placentaire

Des résultats contradictoires ont été rapportés en ce qui concerne les effets de l'adiponectine sur l'angiogenèse. Ouchi et ses collaborateurs ont montré, *in vitro*, que cette adipokine augmente la différenciation des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine en structures de type capillaire et favorise la croissance des vaisseaux sanguins (Ouchi et al., 2004). Au contraire, d'autres chercheurs ont rapporté que l'adiponectine exerce des effets anti-angiogéniques, *in vitro*, chez la souris (Bråkenhielm et al., 2004). Il est donc difficile de tirer des conclusions définitives sur le rôle de l'adiponectine dans l'angiogenèse au début de la placentation.

➤ Adiponectine et transport placentaire des nutriments

Des expériences effectuées sur des cellules trophoblastiques humaines issues de placenta à terme montrent que la forme longue de l'adiponectine (fAD) diminue l'expression des transporteurs SNATs *via* l'activation de la voie p38-MAPK et la synthèse de céramides induite par le facteur de transcription PPAR- α (Aye et al., 2013; Jones et al., 2010).

De plus, l'administration chronique de fAD chez des souris gravides réduit le transport placentaire des acides aminés conduisant à une réduction de 19 % du poids des souriceaux (Rosario et al., 2012). Cet effet implique la voie de signalisation de l'insuline car les niveaux de phosphorylation du substrat de récepteur de l'insuline (IRS-1) et de la protéine Akt sont diminués à la suite de cette l'administration chronique de fAD. Ainsi, en inhibant le transport des nutriments, l'adiponectine pourrait réguler négativement la croissance fœtale.

➤ Adiponectine et immunité/inflammation placentaire

L'adiponectine exerce un effet anti-inflammatoire dans de nombreux tissus et organes, y compris l'endomètre. De manière surprenante, l'adiponectine agit comme une molécule pro-inflammatoire dans le placenta à terme. En effet, plusieurs études montrent que l'adiponectine, *in vitro*, stimule la production des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8 et le TNF- α et la sécrétion de la prostaglandine PGE2 dans le placenta à terme (Lappas et al., 2005; McDonald and Wolfe, 2011). Les auteurs suggèrent que par cette action, l'adiponectine pourrait être impliquée dans les processus de travail et d'accouchement.

L'adiponectine exerce également un effet immuno-modulateur. En effet, cette adipokine induit la voie CD24/Sigle C10 dans le ST de placenta humain à terme (McDonald and Wolfe, 2011). CD24 et Sigle C10 sont impliqués dans l'inhibition de la réponse immunitaire maternelle aux antigènes fœtaux (Chen et al., 2009). En régulant positivement l'expression de CD24/Sigle C10, l'adiponectine pourrait donc favoriser la tolérance immunitaire maternelle. L'ensemble des rôles de la leptine et de l'adiponectine dans la mise en place et les fonctions du placenta humain est résumé dans la **figure 42**.

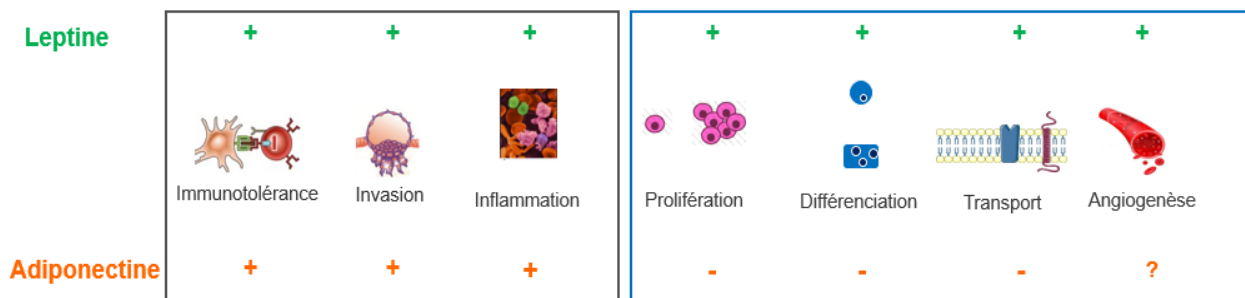


Figure 42 : Rôles *in vitro* de la leptine et de l'adiponectine dans le placenta humain

C. La fonction immunitaire du placenta

La tolérance immunologique pendant la grossesse constitue l'un des paradoxes fondamentaux de la vie. En effet, l'embryon est assimilé à un greffon semi-allogénique pouvant être reconnu comme du « non-soi » (Finn et al., 1977). Il a longtemps été considéré que la grossesse était un état immunologique neutre et inactif. Cependant, de nombreuses découvertes ont mis en évidence que le système immunitaire au niveau du site d'implantation embryonnaire est actif, fonctionnel et soigneusement contrôlé.

Dans un premier temps, l'embryon limite son antigénicité *via* la régulation des molécules d'histocompatibilité exprimées à la surface des cellules trophoblastiques. En effet, l'expression des protéines du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), aussi nommé antigène leucocytaire humain (HLA) est étroitement contrôlée pendant la grossesse chez les mammifères (Braud et al., 1999). Le trophoblaste humain exprime spécifiquement des molécules de **la classe I** (HLA-C et HLA-E, -F et -G) qui sont décrites comme des molécules monomorphes et mauvais présentateurs d'antigènes. Ainsi, les trophoblastes ne sont pas reconnus comme du « non-soi » par les lymphocytes T maternels. En revanche, les ARN messagers des gènes du CMH de **classe II** dont HLA-D ne sont pas traduits dans les trophoblastes humains et ne sont pas détectés dans les CTV et CTEV (Gurka and Rocklin, 1987; Hunt and Orr, 1992; Hunt et al., 2010). La molécule HLA-G exerce un rôle fondamental dans l'immunité de la grossesse en induisant l'apoptose des lymphocytes T-CD8⁺ maternels

(Le Bouteiller and Tabiasco, 2006).

Les cellules trophoblastiques sécrètent également des molécules immunosuppressives telles que la P4, l'hCG, l'HLA-G soluble, le TGF- β et le *progesterone induced blocking factor* (PIBF), qui inhibent la cytotoxicité des cellules immunitaires maternelles. Les trophoblastes sécrètent également des protéines tel que le MCP, capables de neutraliser les molécules du complément.

Enfin, les trophoblastes humains favorisent la tolérance maternelle en stimulant le recrutement et la différenciation des lymphocytes Treg, des macrophages, des DC et des cellules uNK à l'interface foëto-maternelle. En effet, il a été montré qu'au cours du premier trimestre, les cellules uNK, les DC et les macrophages s'infiltrent dans la décidue et s'accumulent autour des cellules invasives du trophoblaste (Cartwright et al., 2010; Harris, 2010). Des études réalisées dans le modèle murin montrent que la suppression des macrophages, des cellules uNK ou des DC, au cours des premiers stades de développement, a des effets délétères sur le développement placentaire et l'implantation embryonnaire (Bulmer, 1992; Veenstra van Nieuwenhoven et al., 2003). Ces données mettent en évidence l'importance du recrutement des cellules immunitaires à l'interface foëto-maternelle.

Les cellules **Treg** semblent participer à l'immunotolérance placentaire en produisant l'IL-10 aux propriétés anti-inflammatoires (Asseman et al., 1999; Belkaid et al., 2002). Cependant, les fonctions directes des Treg pendant la grossesse nécessitent des études complémentaires.

Après la fécondation, le nombre de **macrophages** utérins augmente immédiatement, de sorte que 20 à 30 % des leucocytes de la décidue sont des macrophages en début de grossesse (Golic et al., 2016; Gordon and Taylor, 2005). Les macrophages de la décidue jouent un rôle dans le remodelage des artères spiralées et dans la protection du foetus contre les infections intra-utérines (Bulmer et al., 2010; Kämmerer et al., 2003). De plus, les macrophages participent directement à l'immunotolérance. En effet, au cours de l'invasion trophoblastique, les macrophages jouent un rôle primordial dans l'élimination des cellules apoptotiques empêchant ainsi la libération de contenus intracellulaires potentiellement pro-immunogènes. Ces effets immunomodulateurs peuvent être médiés par les nombreux facteurs sécrétés par

les macrophages tels que les cytokines IL-4, IL-10, TNF- α et le TGF- β (Engert et al., 2007; Lash et al., 2016).

En début de grossesse, les **DC** sont peu présentes et à l'état immature (Kämmerer et al., 2003). Elles apparaissent progressivement au cours de la grossesse et leur fonction principale est de maintenir la tolérance immunitaire. Cette hypothèse a été démontrée par des études *in vitro*, qui révèlent que les DC pourraient jouer un rôle dans l'activation des Th2 (Miyazaki et al., 2003). Dans la décidue, les DC semblent interagir étroitement avec les cellules uNK (Andrews et al., 2003; Kämmerer et al., 2003). Des études *in vitro* montrent en effet une prolifération et une activation accrues des cellules uNK après une co-culture avec des DC de la décidue (Laskarin et al., 2008).

Les cellules **uNK** participent activement au contrôle de l'angiogenèse (Moffett and Colucci, 2014; Moffett and Loke, 2006). En effet, lorsque les cellules uNK sont activées *in vitro* par l'interleukine IL-15, elles produisent des molécules essentielles au processus angiogénique et au remodelage artériel en début de grossesse, tels que l'interleukine IL-8, la protéine interféron-inductible (IP-10), le VEGF, la PGH, l'IFN- γ et le TNF- α (Hanna et al., 2006; Wallace et al., 2012). Les cellules uNK jouent également un rôle dans le maintien de la tolérance pendant la grossesse (Kopcow et al., 2005).

L'ensemble des cellules immunitaires et les facteurs sécrétés à l'interface foëto-maternelle sont illustrés dans la **figure 43**.

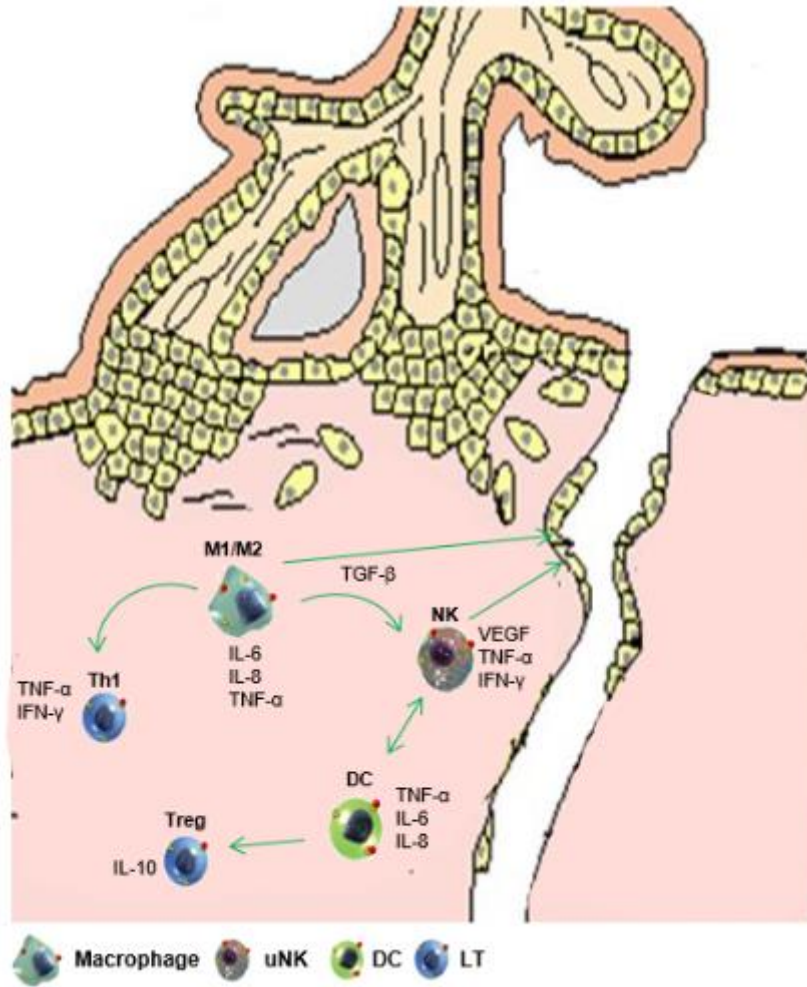


Figure 43 : Rôles des cellules immunitaires à l'interface fœto-maternelle

Les cellules immunitaires à l'interface maternelle participent activement aux processus de tolérance immunitaire et de remodelage vasculaire. Elles sont indispensables au bon développement placentaire.

Chapitre 3 : Impact de l'obésité sur les fonctions de reproduction de la femme

I. Généralités

Les fonctions de reproduction sont finement régulées par des facteurs endocrine et paracrine qui agissent sur les différents organes composant l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (ou HPG, *hypothalamic-pituitary-gonads axis*) (McGee and Hsueh, 2000). Un défaut de la régulation peut être associé directement et indirectement à une infertilité. D'après le comité de l'American Society of Reproductive Medicine Practice, l'infertilité est une maladie définie comme un échec de grossesse, après 12 mois ou plus, de tentative de conception naturelle. Actuellement, l'infertilité est un problème en forte hausse et les causes peuvent être multiples. De nombreuses études se sont intéressées au rôle de l'environnement (pollution, stress au travail, alimentation etc...) sur la santé reproductive de l'espèce humaine.

Comme décrit précédemment, l'obésité est clairement associée au développement de nombreux troubles de la santé tels que l'hypertension, le diabète mais également à un risque accru de développer des cancers du sein, de l'endomètre ou du colon. En outre, l'obésité joue un rôle important dans les **troubles de la reproduction**, particulièrement chez la femme. En effet, il a été mis en évidence que les femmes obèses présentent une diminution nette de la fertilité avec un délai de conception augmenté de 9 mois en moyenne. Parmi ces femmes obèses, 75 % débutent une grossesse (Gesink Law et al., 2007). Plusieurs études montrent que chez les femmes obèses, le risque d'infertilité est trois fois plus élevé que dans la population de femmes normo-pondérées.

Il est bien démontré que l'infertilité associée à l'obésité est multifactorielle, incluant une altération du développement du follicule ovarien, du développement qualitatif et quantitatif de l'ovocyte, de la fécondation, du développement embryonnaire et de l'implantation (Jungheim et al., 2013). Les femmes enceintes obèses présentent également un risque accru de complications de la grossesse, telles que la pré-éclampsie, le diabète gestationnel ou des

naissances avant terme.

II. Axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (HPG)

Chez la femme obèse et dans plusieurs modèles murins obèses, un profil hormonal **d'hypogonadisme central** est observé. Chez la femme obèse, cet hypogonadisme central est dû à une augmentation de l'aromatisation périphérique des androgènes en œstrogènes, et plus particulièrement en œstradiol et en œstrone (Jain et al., 2007). Les œstrogènes exercent un rétrocontrôle négatif sur l'axe HPG, affectant ainsi la production de gonadotrophines telles que la **GnRH**. De plus, la sécrétion d'un neuropeptide appelé kisspeptine est également diminuée chez les patientes obèses. La kisspeptine est décrite comme un puissant stimulateur des neurones à GnRH chez les mammifères. Elle participe donc également à la mise en place de l'hypogonadisme en cas d'obésité (Castellano et al., 2010). En outre, la sécrétion de **LH** est également diminuée chez la femme obèse (Grenman et al., 1986; Jain et al., 2007). L'équipe de Jain et al, à plus précisément montré chez les femmes obèses que les pulses de LH sont d'amplitude plus faible mais de fréquence égale aux femmes normo-pondérées. Cette diminution semble être liée à la réponse hypophysaire à la GnRH endogène atténuée par l'obésité.

Par ailleurs, les femmes obèses présentent une **hyperandrogénie** associée à l'hyperinsulinémie. En effet, l'augmentation de la sécrétion d'insuline altère les fonctions hépatiques et en particulier conduit à une diminution de la production hépatique de la SHBG. Cette diminution entraîne ainsi une hausse des androgènes libres circulants chez la femme obèse (Wei et al., 2009). De plus, l'hyperinsulinémie entraîne une diminution de l'expression de la protéine *insulin growth factor binding protein-1* (IGFBP-1) dans le foie, augmentant la disponibilité du facteur IGF-1. Ce facteur de croissance stimule la production des androgènes par les cellules de la thèque et participe ainsi à l'hyperandrogénisme (Giudice, 1992).

L'obésité se caractérise par une forte augmentation des taux circulants de leptine et inversement par une forte diminution des concentrations circulantes d'adiponectine. Nous

allons donc dans la suite de ce chapitre nous intéresser aux rôles de ces deux adipokines dans la régulation des fonctions de reproduction chez la femme obèse.

➤ Effet de la leptine sur la sécrétion de GnRH et LH

L'hypothèse selon laquelle la leptine joue un rôle important dans la régulation de la sécrétion de GnRH découle de plusieurs résultats. La souris *ob^{-/-}/ob^{-/-}* invalidée pour le gène de la leptine est stérile et possède des organes reproducteurs atrophiques. Un traitement par la leptine rétablit le système reproducteur chez la souris *ob^{-/-}/ob^{-/-}*, entraînant la croissance et le fonctionnement des organes reproducteurs et rétablissant la fertilité *via* la sécrétion des gonadotrophines (Barash et al., 1996; Chehab et al., 1996). En condition physiologique, la leptine exerce dans l'hypothalamus un effet stimulant sur l'axe HPG en augmentant la sécrétion de GnRH dans les neurones du noyau ARC, *via* son récepteur LEPRb. En revanche, elle exerce des effets négatifs dans la stéroïdogénèse ovarienne (Brannian et al., 1999).

La leptine exerce également des effets directs sur l'hypophyse antérieure (Jin et al., 1999). Des études *in vitro* de tissu hypophysaire ont démontré que la leptine induit une augmentation dose dépendante de la libération de LH et de FSH (Yu et al., 1997). De plus, plusieurs études sur la brebis et la vache ont démontré que l'inhibition de la sécrétion de LH par une alimentation restreinte était inversée lors d'un traitement par la leptine, démontrant une association positive entre la sécrétion de LH et la leptine (Amstalden et al., 2002; Morrison et al., 2001). En cas d'obésité, on observe une altération des effets de la leptine sur l'hypothalamus, qui s'expliquent par la mise en place d'une leptino-résistance centrale. L'arrêt du signal leptine conduit à la diminution de la sécrétion des hormones gonadotropes. Ainsi la leptino-résistance participe également à l'établissement de l'hypogonadisme central. De plus, chez l'Homme et les rongeurs qui présentent un déficit en LEPR, on observe également un hypogonadisme central. Ces résultats confirment que la leptino-résistance est bien associée à cette dérégulation de l'axe HPG (Moschos et al., 2002).

➤ Effet de l'adiponectine sur la sécrétion de GnRH et LH

Chez la souris, des études *in vitro* ont décrit que l'adiponectine, *via* l'activation de l'AMPK, inhibe dans les cellules hypothalamiques la transcription du gène de la kisspeptine qui est le signal en amont de la libération de la GnRH. Ainsi, les auteurs observent également une diminution de la sécrétion de GnRH à la suite d'un traitement des cellules de l'hypothalamus par l'adiponectine (Cheng et al., 2011; Wen et al., 2012).

Par ailleurs, l'équipe de Rodriguez-Pacheco et al. a montré que l'adiponectine affecte la sécrétion d'hormones hypophysaires. En effet, le traitement *in vitro* de cellules hypophysaires de rat et de souris par l'adiponectine entraîne une réduction de la synthèse et de la libération de LH (Lu et al., 2008; Rodriguez-Pacheco et al., 2007). Chez le porc, l'administration *in vivo* d'adiponectine affecte la sécrétion de LH et de FSH de manière dépendante de la phase du cycle œstral (Kiezun et al., 2014). Ainsi, en conditions physiologiques, l'adiponectine exerce un rétrocontrôle négatif de l'axe HPG, *via* la modulation de la sécrétion des gonadotrophines par le signal kisspeptine.

A ce jour, aucune donnée ne précise l'impact des taux sériques diminués d'adiponectine en cas d'obésité sur la sécrétion des gonadotrophines. Néanmoins on peut supposer une augmentation de la sécrétion de GnRH et LH *via* la levée de l'effet inhibiteur de l'adiponectine.

III. L'ovogenèse

L'hyperinsulinémie et l'hyperandrogénie observés chez la femme obèse, conduisent à des **anovulations** ayant pour conséquence le développement ou l'aggravement d'un **syndrome d'ovaire polykystique** ou SOPK (Pasquali et al., 2003). L'excès d'androgènes intra-ovariens pourrait être associé à une atrésie folliculaire prématurée favorisant l'anovulation (Poretsky et al., 1999). Par ailleurs, il a été démontré, chez la souris obèse, une diminution de la taille des ovocytes, un délai augmenté de la maturation méiotique et une augmentation de l'apoptose folliculaire (Jungheim et al., 2010). Chez la souris et la femme obèse, des études ont également observé une augmentation des mésappariements des chromosomes méiotiques

au cours de l'ovogenèse (Machtinger et al., 2012). L'ensemble de ces altérations conduisent ainsi à une pauvre qualité ovocytaire chez les individus obèses.

Un des mécanismes pouvant expliquer la faible qualité ovocytaire est l'altération de l'activité mitochondriale des follicules ovariens. En effet, cet organite joue des rôles importants dans le développement et la maturation folliculaire. Dans un modèle de souris obèses, il a été démontré que les mitochondries des ovocytes présentent des anomalies structurales (diminution du nombre de crêtes) et une production de ROS multipliée par 2 (Luzzo et al., 2012). D'autre part, il a été montré que chez les femmes obèses en parcours d'assistance médicale à la procréation, le liquide folliculaire présente une élévation des taux de triglycérides, d'acides gras libres et de cytokines inflammatoires telles que l'IL-6, le TNF- α et la leptine (Broughton and Moley, 2017). Il a également été mis en évidence une morphologie anormale du complexe cumulus-ovocyte corrélée à des taux d'AG libres élevés dans le fluide folliculaire chez les femmes obèses (Jungheim et al., 2011). Des études à la fois chez l'animal et l'Homme ont montré également une accumulation excessive d'acides gras libres dans l'ovaire associée à un stress du réticulum endoplasmique (RE) (Cummins, 2004; Dumollard et al., 2007; Torner et al., 2004). Ces données combinées suggèrent que les taux élevés d'AG et de cytokines inflammatoires observés dans le liquide folliculaire d'individus obèses peuvent être à l'origine des altérations de la folliculogenèse.

➤ Effet de la leptine sur l'ovogenèse

L'ARNm de la leptine est détecté aux stades folliculaires précoces, alors que la leptine est exprimée dans les follicules matures spécifiquement (Archanco et al., 2003). Cette adipokine est connue pour son rôle inhibiteur de la stéroïdogénèse. Chez l'Homme, une étude *in vitro* a montré qu'un traitement avec des doses physiologiques moyennement élevées (à partir de 10 ng/ml), la leptine inhibe la stéroïdogénèse dans les cellules de la granulosa et de la thèque (Agarwal et al., 1999). Chez l'animal, il a clairement été montré que des concentrations élevées de leptine altèrent le développement folliculaire, l'ovulation et la maturation ovocytaire (Duggal et al., 2000). Par conséquent, dans les cas de stockage excessif d'énergie ou de troubles

métaboliques, tels que l'obésité et le SOPK, la leptine exerce un effet inhibiteur sur les gonades. Ainsi, des concentrations élevées de leptine dans l'ovaire peuvent inhiber la production d'œstradiol et interférer avec le développement des follicules dominants et la maturation de l'ovocyte, prédisposant à l'anovulation.

➤ Effet de l'adiponectine sur l'ovogenèse

L'adiponectine semble participer à l'initiation de modifications pré-ovulatoires dans l'ovaire et moduler le processus de stéroïdogénèse. En effet, dans les cellules de la granulosa humaine, l'adiponectine augmente la sécrétion de progestérone et d'œstradiol (Chabrolle et al., 2009; Pierre et al., 2009). Dans la lignée de granulosa humaine KGN, l'inactivation spécifique d'ADIPOR1 et d'ADIPOR2 montre qu'ADIPOR1 est impliqué dans la survie cellulaire, alors qu'ADIPOR2 est préférentiellement impliqué dans la stéroïdogénèse (Pierre et al., 2009). De plus, l'inhibition du gène de l'adiponectine chez la souris perturbe la stéroïdogénèse, le développement folliculaire et réduit la fertilité (Cheng et al., 2016). En effet, les souris invalidées pour le gène de l'adiponectine sont viables mais hypofertiles. Les animaux présentent des anomalies de l'axe HPG et des fonctions ovariennes (Cheng et al., 2016). Dans plusieurs modèles y compris chez l'Homme, l'adiponectine *in vitro* améliore le processus de maturation ovocytaire, les taux de fécondation et le clivage embryonnaire en stimulant la maturation méiotique des ovocytes *via* la voie p38-MAPK. Elle augmente ainsi le nombre d'embryons atteignant le stade blastocyste (Chappaz et al., 2008; Richards et al., 2012). La diminution de la sécrétion d'adiponectine chez la femme obèse et dans le cas du SOPK, pourrait conduire à des défauts de maturation ovocytaire et donc à une anovulation.

IV. L'implantation embryonnaire

L'embryon préimplantatoire est également affecté par l'obésité maternelle. En effet, les femmes obèses sont plus susceptibles de créer des embryons de mauvaise qualité (Carrell et al., 2001; Metwally et al., 2007). L'équipe de Leary et al. a montré que les embryons de femmes

avec un IMC > 25 kg/m² sont moins susceptibles de se développer après la fécondation. Parmi les embryons atteignant le stade blastocyste, le nombre de cellules dans le trophoctoderme est diminué. De plus, une plus faible consommation du glucose et une augmentation des taux de triglycérides dans les blastocystes sont observées (Leary et al., 2015), suggérant une altération de la qualité embryonnaire chez la femme obèse.

L'endomètre représente une autre cible de l'obésité. Certains rapports ont clairement décrit une altération de la réceptivité de l'endomètre chez les femmes obèses pendant la fenêtre implantatoire. Plus précisément, les femmes avec un IMC > 30 kg / m² présentent des taux de grossesse significativement plus faibles que les femmes normo-pondérées (Dessolle et al., 2009). Des études sur des souris obèses ont montré que le processus de décidualisation de l'endomètre est altéré (Rhee et al., 2016). De plus, des cellules stromales endométriales humaines immortalisées et primaires isolées à partir d'endomètre de femmes obèses, présentent des capacités de décidualisation diminuées (Hill et al., 2007; Rhee et al., 2016). Il semblerait que ces effets de l'obésité sur la décidualisation soient associés à une élévation des cytokines pro-inflammatoires et de la production de ROS (Broughton and Moley, 2017). De plus, les taux d'haptoglobine circulants (marqueur inflammatoire) sont augmentés chez la femme obèse et sont fortement corrélés aux fausses couches à répétition (Metwally et al., 2014).

➤ Effet de la leptine sur l'implantation

Les embryons préimplantatoires expriment l'ARNm de LEPR suggérant un rôle important de la leptine dans le développement embryonnaire. Il a été montré que des blastocystes éclos en culture sécrètent des concentrations de leptine significativement plus élevées que les blastocystes arrêtés. Ainsi, la leptine pourrait être un marqueur de la viabilité embryonnaire (González et al., 2000).

Par ailleurs, la leptine semble être impliquée dans l'acquisition de la réceptivité utérine. En effet, elle stimule l'expression des marqueurs de la réceptivité, tels que les intégrines αV et $\beta 3$ dans des cultures de cellules épithéliales endométriales humaines (Ramos et al., 2005). De

plus, la leptine semble également impliquée dans le remodelage vasculaire et l'angiogenèse en favorisant l'expression de marqueurs pro-antigéniques (VEGF) et inflammatoire (IL-1) (Carino et al., 2008). Il a été démontré que la leptine favorise l'expression de marqueurs de la décidualisation tels que la prolactine (Tennekoon et al., 2007). De plus, un déficit d'expression du LEPR dans l'endomètre a été mis en évidence chez des patients présentant une hypofertilité et des signes d'anomalie de maturation de l'endomètre (Alfer et al., 2000). Ainsi, la leptine favorise le développement d'un endomètre réceptif en contrôlant le phénomène de décidualisation. L'augmentation des taux circulants de leptine observée au cours de l'obésité pourrait altérer la réceptivité de l'endomètre et l'implantation.

➤ Effet de l'adiponectine sur l'implantation

L'adiponectine semble jouer un rôle important en début de grossesse, en particulier lors de l'implantation. En effet, l'expression des récepteurs de l'adiponectine est accrue dans les cultures primaires de cellules stromales humaines pendant le processus de décidualisation (Gamundi-Segura et al., 2015). De plus, plusieurs équipes ont montré une diminution de l'expression des récepteurs de l'adiponectine dans l'endomètre de femmes présentant des échecs répétés d'implantation (Dos Santos et al., 2012; Takemura et al., 2005). De récentes études se sont portées sur les effets *in vitro* de l'adiponectine sur les cellules endométriales stromales humaines. Ces études montrent que l'adiponectine exerce des effets négatifs sur la décidualisation et joue un rôle actif dans le processus d'implantation embryonnaire en limitant l'invasion des cellules trophoblastiques dans l'endomètre (Duval et al., 2016, 2017). De plus, l'adiponectine maternelle favorise la production de glycogène dans les cellules déciduales suggérant un rôle de l'adiponectine dans la nutrition histiotrophe de l'embryon (Duval et al., 2018). L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que l'adiponectine joue un rôle important dans l'établissement de la réceptivité utérine et dans les étapes précoces d'implantation embryonnaire. Les faibles taux sériques de l'adiponectine observés chez les femmes obèses pourraient être associés à la baisse de la réceptivité endométriale et ainsi contribuer aux échecs de d'implantation.

V. La grossesse

Un certain nombre d'études ont examiné l'association entre l'IMC et l'issue de la grossesse. Il est clairement établi qu'un IMC élevé avant et pendant la grossesse est associé à un risque accru de complications de la grossesse (Fitzsimons et al., 2009; Leddy et al., 2008; Stubert et al., 2018). L'obésité maternelle est associée à une augmentation des risques de développer des troubles hypertensifs de la grossesse, pouvant aboutir au développement d'une pré-éclampsie (PE) (Sattar et al., 2001). Cette pathologie, qui se définit par une hypertension *de novo*, associée à une protéinurie supérieure à 300 mg/jour apparaît après la 20^{ème} semaine de grossesse. La pré-éclampsie est associée à un défaut du processus invasif du placenta lors de l'implantation, caractérisé notamment par l'absence de bouchons trophoblastiques dans la lumière des artères utérines. 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. En effet, les placentas issus de grossesses pré-éclampsiques sont de petites tailles et présentent un défaut de vascularisation (Roberts and Escudero, 2012).

L'obésité maternelle est associée à une altération de la fonction vasculaire et à une pression artérielle systémique élevée. En effet, des mesures de la vascularisation sous-cutanée chez la femme obèse ont montré une altération de l'intégrité endothéliale (Ramsay et al., 2002). De plus, il existe une association significative entre l'IMC et le risque de thromboembolie veineuse, qui pourrait s'expliquer par ces anomalies vasculaires. En résumé, au cours de l'obésité maternelle, ces altérations vasculaires pourraient contribuer à l'apparition de pathologies de la grossesse.

L'obésité maternelle est également associée à un statut métabolique perturbé. Les femmes obèses enceintes présentent une dyslipidémie caractérisée par des taux sanguin d'HDL faibles, une concentration plus élevée en triglycérides et une hyperinsulinémie. Ainsi, ces altérations sont associées au risque accru des femmes obèses de développer un DG

(Fitzsimons et al., 2009). De plus, les médiateurs inflammatoires sériques augmentés chez la femme obèse exercent des actions insulino-résistantes. Ces molécules pro-inflammatoires participent donc au développement d'un DG. L'équipe de Weiss et al, a en effet montré que les femmes obèses ont environ 3 fois plus de chances de développer un DG que le groupe normo-pondéré (Weiss et al., 2004).

Ainsi, les anomalies métaboliques, inflammatoires et fonctionnelles décrites en cas d'obésité maternelle contribuent au développement de complications de la grossesse (**Table 3**).

Complications	Prévalence IMC [18-25 kg/m ²] (%)	Prévalence IMC [≥ 30 kg/m ²] (%)
Diabète gestationnel	1	9
Hypertension	5	17
Pré-éclampsie	3	10
Thromboembolie	0,6	2,5
Fausse couches précoces	10,5	12,5
Césarienne	14,3	42,6

Table 3 : Complications maternelles de la grossesse associées à l'obésité (d'après Meaghan Leddy et al. 2008 ; Fitzsimons et al. 2009 ; Stubert et al. 2018)

➤ Effet de la leptine au cours de la grossesse

Au cours de la grossesse, les taux de leptine sont élevés comparé à l'état non gravide (Helland et al., 1998; Masuzaki et al., 1997). Les contributions relatives de la leptine placentaire et de la leptine maternelle aux taux circulants maternels ont récemment été décrites par Linnemann et al. à l'aide d'une technique de perfusion *in vitro*. Cette étude montre que seulement 1 à 2% de la leptine placentaire passe dans la circulation fœtale, alors qu'environ 98% est dirigé vers la circulation maternelle (Linnemann et al., 2000).

Au cours de la grossesse, la leptine exerce des actions paracrine et/ou autocrine à l'interface fœto-maternelle. En effet, comme détaillé dans le **chapitre 2**, la leptine contribue au développement placentaire et joue un rôle important dans les échanges fœto-maternels et la tolérance immunitaire. Ainsi, la leptinémie accrue associée à l'obésité et l'établissement

possible d'une leptino-résistance périphérique pourrait contribuer au développement de complications de la grossesse telles que la PE et le DG.

➤ Effet de l'adiponectine au cours de la grossesse

Il est aujourd'hui bien établi que l'adiponectine ne constitue pas une hormone placentaire. Aucun type cellulaire du placenta ne sécrètent l'adiponectine (Benaitreau et al., 2010a, 2010b). Ainsi, l'adiponectine sérique maternelle est relativement constante tout au long de la grossesse et résulte principalement de la production par le TA (Mazaki-Tovi et al., 2008). Le rôle de l'adiponectine dans le maintien et le déroulement de la grossesse est de plus en plus décrit chez l'Homme. De nombreuses études se sont portées sur son rôle dans le développement placentaire et ont été détaillées précédemment dans le **chapitre 2**.

Au cours de la grossesse, l'adiponectine contribue au développement placentaire et joue un rôle dans la modulation des échanges fœto-maternels. Ainsi, l'hypoadiponectinémie observée au cours de l'obésité contribue au développement de complications de la grossesse associées à l'obésité telles que le diabète gestationnel (Pala et al., 2015). En revanche, le lien entre l'adiponectinémie et la pré-éclampsie n'est pas clairement établi (Abd-Alaleem et al., 2011; Dalamaga et al., 2011; Takemura et al., 2005).

Partie 2

DEMARCHE

EXPERIMENTALE

I. Présentation du laboratoire

L'ensemble de ces travaux de thèse ont été réalisés au sein du laboratoire Gamètes-Implantation-Gestation (GIG), dans l'équipe d'accueil (EA)-7404, dirigée par le professeur François Vialard. Ce laboratoire est rattaché à l'unité de formation et de recherche (UFR) Simone Veil-Santé, de l'Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, membre de l'Université Paris-Saclay. L'équipe se compose de personnels universitaires et hospitalo-universitaires. Les travaux sont menés en étroites collaborations avec le centre hospitalier intercommunal (CHI) de Poissy-Saint-Germain-en-Laye. Dans les prochains mois, l'équipe évoluera en unité mixte de recherche (UMR) suite à son rapprochement avec l'UMR 1198 BDR, Biologie du développement et Reproduction, de l'INRA de Jouy-en-Josas.

Les activités de recherche de l'EA-7404 s'organisent autour de trois thématiques distinctes, dont l'objectif principal est d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans l'infertilité humaine et dans la survenue de complications de la grossesse. Ainsi, la partie « Gamètes » étudie les mécanismes conduisant à la constitution d'une anomalie morphologique particulière du spermatozoïde (les vacuoles) et les mécanismes moléculaires associés au développement d'une azoospermie. La partie « Implantation » s'intéresse quant à elle aux phases d'implantation embryonnaire et de placentation. Elle étudie notamment le développement du placenta humain du premier trimestre d'une part, et d'autre part les phénomènes de différenciation et de réceptivité endométriale. L'objectif est de comprendre les interactions mises en place entre le fœtus et l'endomètre au cours de la grossesse saine et pathologique. Enfin, le groupe « Gestation » s'intéresse d'une part, à la mise au point d'un outil diagnostique visant à détecter les pathologies fœtales (trisomie 21, par exemple). D'autres parts, elle s'intéresse aux fonctions placentaires au troisième trimestre lors de grossesses saine et pathologique (obésité, par exemple) et aux mécanismes moléculaires associés. De plus, le développement de la plateforme de perfusion placentaire au sein du laboratoire permet également d'étudier le passage transplacentaire de molécules d'intérêt (nutriments, médicaments ...) entre les compartiments maternel et fœtal. Enfin, il a récemment été

développé en collaboration avec l'INRA, un modèle de greffe utérine chez la brebis.

II. Contexte de recherche

L'ensemble des expérimentations effectuées au cours de cette thèse ont été réalisées au sein de l'équipe GIG, sous la tutelle du professeur Marie-Noëlle Dieudonné. Le projet de thèse s'intitule « Impact de l'obésité maternelle sur les fonctions placentaires : rôles de la leptine et de l'adiponectine ». Comme décrit dans la **Partie I**, la littérature démontre clairement l'impact de l'excès de masse adipeuse sur la fonction de reproduction chez la femme. Néanmoins, les données sont controversées concernant ses effets sur les fonctions placentaires et les mécanismes moléculaires impliqués ne sont pas clairement établis. Au cours de la grossesse, le placenta représente une cible potentielle de l'obésité maternelle. Bien que les données soient contradictoires, il semble que chez l'Homme comme dans les modèles animaux, le statut métabolique maternel, en cas d'obésité, induit des changements morphologiques (poids, taille et histologie) des placentas (Dubé et al., 2012; Frias et al., 2011; Kim et al., 2014; Loardi et al., 2016; Roberts et al., 2011a; Zhu et al., 2009). Ces modifications de la biométrie placentaire pourraient conduire à des altérations fonctionnelles.

Par ailleurs, il est clairement établi que l'obésité est associée à une inflammation systémique chronique, avec une production accrue de cytokines pro-inflammatoires. L'hypothèse émise est que ce statut hyper-inflammatoire pourrait également s'observer localement dans les placentas humains. En effet, il a été démontré que les placentas de femmes obèses présentent une accumulation excessive de macrophages. De plus, ces macrophages résidents expriment des niveaux plus élevés d'ARNm de cytokines pro-inflammatoires (Challier et al., 2008). Néanmoins ces résultats ne sont pas retrouvés par d'autres équipes (Allbrand et al., 2014; Loardi et al., 2016; Roberts et al., 2011b). De plus, la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires par les placentas issus de femmes obèses n'a pas été étudiée.

L'obésité maternelle se caractérise également par une dyslipidémie et un excès d'acides gras circulants. Il a été bien décrit que les placentas issus de femmes obèses présentent une lipotoxicité élevée associée à des altérations de la fonction mitochondriale. En effet, plusieurs

études ont mis en évidence une augmentation du stress oxydatif et nitratif et à une baisse significative de la respiration mitochondriale dans les placentas de femmes obèses (Hastie and Lappas, 2014; Malti et al., 2014; Mele et al., 2014).

Le placenta est le lieu des échanges entre la mère et le fœtus. Le contrôle du passage transplacentaire des nutriments est essentiel pour le bon développement fœtal. La littérature concernant l'impact de l'obésité maternelle sur le transport placentaire des nutriments est très abondante. Néanmoins, les résultats sont peu convergents. Concernant le transport du glucose, l'équipe de Acosta et al, a mis en évidence une corrélation positive entre le poids de naissance et l'expression placentaire des transporteurs GLUT1 et GLUT3 (Acosta et al., 2015). Concernant le transport des acides aminés, une équipe a observé une augmentation de l'expression des transporteurs SNATs dans le placenta de femmes obèses (Jansson and Powell, 2013). Cependant, l'équipe de Farley et al. ne retrouve pas d'effet de l'obésité maternelle sur l'activité de ces mêmes transporteurs (Farley et al., 2010). De plus, il semblerait que le système L ne soit en aucun cas affecté par l'obésité maternelle (Gaccioli et al., 2015a). Enfin, chez la femme souffrant d'obésité, le transport des lipides placentaires semble altéré. Une équipe a montré une augmentation des ARNm et des protéines FAT/CD36 et FATP6. A l'inverse, il a été observé une diminution des ARNm et des protéines de FATP4 et FABP1 et de la protéine de FABP3, 4 et 7. Cette même étude montre également une augmentation de l'activité de la LPL et de la lipase endothéliale (EL) (Dubé et al., 2012).

Parallèlement aux modifications morphologiques et fonctionnelles du placenta, l'obésité maternelle pourrait être à l'origine de modifications épigénétiques dans le placenta humain. Cependant, il existe relativement peu de données sur le profil des marques épigénétiques des histones et/ou la méthylation globale de l'ADN dans le placenta en cas d'obésité. Une étude a mis en évidence que l'obésité maternelle est associée à une augmentation de la méthylation globale de l'ADN dans le placenta (Nomura et al., 2014).

Enfin, la leptine et l'adiponectine, dont les concentrations circulantes sont fortement altérées au cours de l'obésité, sont des acteurs majeurs du développement placentaire. Cependant, très peu d'études se sont intéressées à l'impact de l'obésité maternelle sur l'expression des

systèmes leptine et adiponectine dans le placenta à terme. L'équipe de Saben et al, a montré une diminution de l'ARNm de la leptine et du récepteur ADIPOR1 dans les placentas de femmes obèses (Saben et al., 2014). En revanche, Farley et al, a montré une diminution de l'expression du récepteur LEPR spécifiquement (Farley et al., 2010). Enfin, l'équipe d'Allbrand et al, n'a pas observé de différence d'expression de la leptine (ARNm) entre les placentas de femmes obèses et les placentas issus de femmes normo-pondérées (Allbrand et al., 2014).

III. Objectifs du travail de thèse

Dans ce contexte où les données de la littérature sont controversées et très parcellaires, l'objectif de ce travail est d'étudier l'impact de l'obésité maternelle sur les fonctions placentaires et les mécanismes moléculaires impliqués, dont les rôles de la leptine et de l'adiponectine, dans les placentas humains de troisième trimestre de grossesse.

Dans un premier temps, le projet s'est initié par le recrutement des patientes en collaboration avec le CHI de Poissy-Saint-Germain-en-Laye. Pour ce faire, nous nous sommes appuyés sur la sélection de critères d'inclusions bien déterminés afin que notre population d'étude soit la plus homogène. De plus, nous avons fait le choix de retenir une population de femmes obèses **sans diabète gestationnel**.

Le premier objectif de ces travaux a été de caractériser de manière approfondie le placenta issu de femme obèse. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés d'une part à sa biométrie, et d'autre part aux fonctions majeures assurées par cet organe, telles que les fonctions immunitaire, d'échange de nutriments et endocrine.

Plus précisément, nous avons étudié, sur des biopsies et des explants issus de placentas de femmes obèses à terme, i) la morphologie et la structure fine des placentas, ii) la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, iii) l'infiltration des cellules immunitaires (macrophages, LT, monocytes) et l'activation des voies de signalisation de l'inflammation. De plus, nous avons étudié l'expression et la fonctionnalité des transporteurs de nutriments (glucose et acides aminés) sur des biopsies et sur des cultures primaires de trophoblastes issus de placentas de femmes obèses et normo-pondérées. Enfin, nous nous sommes intéressés à la fonction

endocrine du placenta. Ainsi, nous avons pu préciser l'impact de l'obésité maternelle sur i) les principales fonctions placentaires et ii) sur le statut inflammatoire du placenta humain à terme. Le deuxième objectif de ces travaux s'est focalisé sur la caractérisation du système leptine et adiponectine dans les placentas de femmes obèses. Pour cela, nous avons mesuré l'expression de la leptine (l'adiponectine n'étant pas exprimé par le placenta) et des récepteurs de la leptine et de l'adiponectine (ARNm et protéines) dans les placentas issus de femmes obèses par comparaison avec les femmes normo-pondérées. Cette étude a été réalisée en distinguant les faces fœtales des faces maternelles du placenta. De plus, la méthylation de l'ADN des promoteurs des systèmes leptine et adiponectine a été étudiée. De cette manière, nous avons pu préciser l'impact de l'obésité maternelle à la fois sur l'expression des ligands et de leurs récepteurs dans le placenta humain ainsi que les mécanismes épigénétiques potentiellement impliqués.

IV. Approches méthodologiques

Pour répondre à ces objectifs de travail de thèse, un total de 39 placentas de femmes témoins et 29 placentas de femmes obèses ont été collectés. Des fragments placentaires ont été prélevés de manière standardisée sur toute l'épaisseur du placenta au centre du disque placentaire.

Le premier objectif visant à caractériser de manière approfondie les placentas de femmes obèses comprend le recrutement de 36 patientes dans le groupe contrôle et 24 patientes dans le groupe obèses pour l'ensemble de l'étude. La mesure de la biométrie placentaire a été réalisée par une approche de stéréologie à partir de coupes histologiques réalisées sur l'entière épaisseur du placenta collecté et colorées à l'éosine et hématoxyline. Le volume et la surface des composants structuraux des placentas (trophoblaste, chambre intervillieuse, vaisseaux fœtaux, mésoenchyme, nœuds et fibrine) ont été mesurés par le logiciel Mercator sur 4 à 5 coupes histologiques par placenta collectés (8 contrôles et 8 obèses). De plus, nous nous sommes focalisés sur les vaisseaux fœtaux en utilisant un marquage à l'aide de deux

anticorps dirigés spécifiquement contre les cellules endothéliales sur des coupes histologiques issues de 8 placentas de femmes contrôles et de 8 placentas de femmes obèses.

Toujours dans le premier objectif, nous avons étudié le statut inflammatoire placentaire. A partir d'explants issus de 5 placentas du groupe contrôle et 5 placentas du groupe « obèse » cultivés pendant 48h, nous avons mesuré la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF- α , IL-1 β , leptine, IL-10, MCP-1) par une technique d'analyse ELISA multiplex. Pour compléter cette approche, nous nous sommes intéressés aux cellules immunitaires présentes dans les tissus placentaires. Sur des coupes histologiques réalisées sur l'entière épaisseur de 8 placentas de femmes témoins et de 8 placentas de femmes obèses, nous avons effectué un marquage immunologique spécifique des monocytes, des macrophages et des leucocytes (comprenant les LT et les LB). Les cellules positives ont été quantifiées *via* le logiciel Aperio Imagescope. L'activation des voies de signalisation a également été mesurée *via* la quantification des protéines ERK, JNK et JAK phosphorylées et totales par immunoblot.

Enfin, par des approches de qPCR et d'immunoblot sur 8 placentas de femmes contrôles et 8 placentas de femmes obèses, nous avons mesuré l'expression des transporteurs du glucose (GLUT1/3) et des acides aminés (LAT1/2, SNAT1/2). Pour compléter cette approche, nous avons mesuré l'efficacité du transfert placentaire des nutriments par une approche de perfusion placentaire sur cotylédons isolés à partir des placentas de femmes contrôles et obèses. La perfusion du placenta permet de reproduire *ex-vivo* la circulation foeto-maternelle *in utero* sous contrôle du pH, de la température et des débits de perfusion (**Figure 44**).

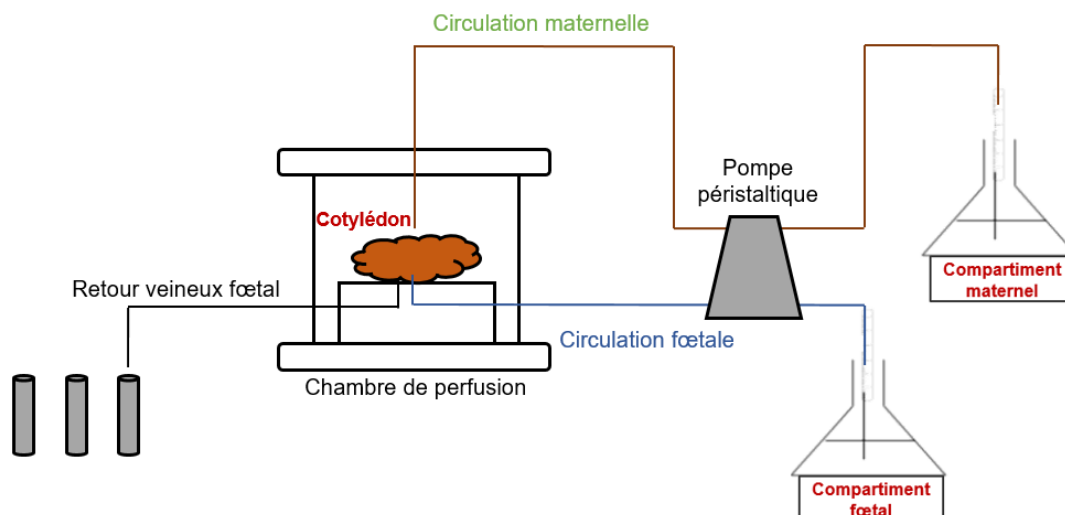


Figure 44 : Schéma de la perfusion placentaire

Le compartiment fœtal contient un milieu restituant les conditions physiologiques. Ce compartiment perfuse le cotylédon *via* une artère et une veine cathétérisées. Le compartiment maternel contient un milieu similaire au compartiment fœtal où sont ajoutées nos molécules d'intérêt. Le retour veineux fœtal comprend le milieu après perfusion du placenta et échange avec le milieu maternel. Il est récupéré au cours des 90 minutes de perfusion et dosé pour la mesure du passage des molécules d'intérêt.

La fonction endocrine a également été évaluée par l'étude de l'expression de l'ARNm de la leptine et de la sécrétion de l'hCG dans des CTV isolés à partir de placenta de femmes contrôles et obèses après 72h de culture (n = 8 pour les deux groupes).

Le deuxième objectif visant à étudier l'expression des systèmes leptine et adiponectine comprend le recrutement de 18 patientes témoins et 12 patientes obèses pour l'ensemble de l'approche. L'étude a débuté par l'analyse en qPCR et immunoblot de l'expression de la leptine, du récepteur de la leptine (LEPR), des récepteurs de l'adiponectine (ADIPOR1/2), sur des biopsies placentaires collectées précisément sur les faces fœtales et maternelles de 9 placentas issus de femmes contrôles et 9 placentas de femmes obèses. Par la suite, nous sommes intéressés aux mécanismes potentiellement impliqués dans la modulation de l'expression des systèmes leptine et adiponectine par une approche épigénétique. Pour cela, nous avons mesuré les taux de méthylation des régions promotrices de nos gènes d'intérêt, à savoir le gène LEP, ADIPOQ, LEPR, ADIPOR1/2 par PCR et pyroséquençage.

V. Collaborations

L'ensemble des expérimentations a été réalisé sur des placentas à terme issus de césariennes programmées au CHI de Poissy-Saint-Germain-en-Laye (CHIPSG). Les prélèvements sanguins maternels au sein de notre population de femmes obèses ont également été réalisés au CHIPSG. Les lames et les marquages histologiques ont été réalisés par le service d'anatomie pathologique du CHIPSG. Ainsi, le bon déroulement de cette thèse est avant tout

lié au dialogue permanent et à la volonté du personnel du CHIPSG (médecins, sages-femmes, personnel soignant), qui a permis le recrutement des femmes incluses dans cette étude et la réalisation de l'ensemble des gestes médicaux nous permettant d'obtenir les prélèvements dont nous avons besoin.

Les analyses épigénétiques ont été réalisées en étroite collaboration avec l'équipe « Mécanismes épigénétiques et construction-prédiction des phénotypes » de l'unité mixte de recherche (UMR) biologie du développement et reproduction (BDR) de l'INRA de Jouy-en-Josas. Les analyses de stéréologie ont également été réalisées en collaboration avec l'équipe « Placenta, environnement et programmation des phénotypes » de l'UMR BDR. Ainsi, c'est par le dialogue et le partage des connaissances avec les équipes de chercheurs de la BDR que j'ai pu réaliser une partie de cette étude.

La plateforme de perfusion placentaire a été mise en place à l'UFR Simone Veil-Santé par le Dr Paul Berveiller de notre équipe GIG au cours de l'année 2017 avec l'aide de l'UMR-S1139 « Physiopathologie & Pharmacotoxicologie Placentaire Humaine/Microbiote Pré & Postnatal » de l'Université Paris Descartes.

Partie 3

RESULTATS

Article 1

Impact de l'obésité maternelle sur les fonctions placentaires

Maternal obesity alters placental nutrient transport associated with inflammatory status and morphology modifications in human term placenta

Perrine Nogues, Esther Dos Santos, Anne Tarrade, Paul Berveiller, Lucie Arnould,
Stanislas Grassin-Delyle, François Vialard, Marie-Noëlle Dieudonné

American Journal of Obstetrics & Gynecology (Soumis)

Introduction

La relation entre la santé de la mère et le développement fœtal est étroitement liée au placenta, qui constitue le site principal des échanges materno-fœtaux. La villosité choriale est l'unité structurale et fonctionnelle du placenta humain. Le syncytiotrophoblaste (couche de cellules épithéliales multinucléées hautement spécialisée recouvrant la surface des villosités choriales) remplit plusieurs fonctions : (i) il forme une barrière physique et immunitaire entre les circulations maternelle et fœtale, (ii) il produit une multitude d'hormones, telles que la gonadotrophine chorionique humaine (hCG) et la leptine, et (iii) il intervient dans le transport des nutriments. Ce dernier facteur dépend de la taille du placenta, de sa morphologie (épaisseur du tissu et de la surface à échanger), de l'activité et de la disponibilité des transporteurs de nutriments et des flux sanguins utéro- et fœto-placentaire. Dans les cellules placentaires, le glucose utilise un transport facilité grâce à deux isoformes de transporteurs (GLUT1 et GLUT3) qui sont fortement exprimées dans le placenta humain à terme. Le transport des acides aminés à travers le placenta se produit selon un mode actif *via* deux isoformes principales du système L (LAT1 et LAT2) et trois isoformes principales du système A (SNAT1, SNAT2 et SNAT4).

L'obésité maternelle est caractérisée par une inflammation chronique de bas grade, entraînant des taux circulants élevés de cytokines pro-inflammatoires tels que les interleukines-1 et 6 (IL-1 et 6), le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α), la protéine chimiotactique monocyttaire 1 (MCP-1), la protéine C-réactive (CRP) et la leptine. En parallèle, une inflammation exacerbée et une lipotoxicité non contrôlée ont été observées dans des placentas issus de femmes obèses. Il est bien établi que le statut immunitaire (population cellulaire et médiateurs) joue un rôle central dans les fonctions placentaires pendant la grossesse. Par conséquent, une inflammation non contrôlée pourrait influencer le développement placentaire. Enfin, des données de la littérature suggèrent que l'obésité maternelle est associée à des modifications de la fonction et de la structure du placenta, susceptibles d'affecter la croissance et le développement du fœtus. Cependant ces données sont aujourd'hui contradictoires et

parcellaires. De plus, les réponses cellulaires et moléculaires à un environnement maternel délétère pendant la grossesse n'ont pas encore été caractérisées de manière détaillée.

Dans ce contexte, notre objectif est d'évaluer l'impact de l'obésité maternelle sur le statut inflammatoire, la morphologie et les niveaux d'expression et d'activité des transporteurs de nutriments dans le placenta à terme issu de femmes obèses.

Résultats

La population étudiée est homogène au regard des critères d'inclusion (obésité maternelle sans diabète gestationnel, âge maternel, terme de grossesse). Nous n'avons pas observé de différence dans le poids des nouveau-nés et le poids des placentas entre les populations de femmes obèses et normo-pondérées. Néanmoins nous avons mis en évidence une diminution de l'efficacité placentaire (poids fœtal/poids placenta) dans le groupe obèse par rapport au groupe contrôle normo-pondéré. De plus, une fois le sexe fœtal pris en compte, on observe que l'efficacité placentaire est plus faible chez les fœtus fille.

Le dosage sérique des lipides (cholestérol total, TG, HDL et LDL) et des marqueurs inflammatoires (haptoglobine, orosomucoïde, CRP) a mis en évidence une **diminution du taux de HDL et une augmentation du taux de CRP sérique** dans le groupe obèse comparé au groupe contrôle. Cet environnement maternel inflammatoire, nous a incités à étudier le statut inflammatoire du placenta. Nous avons mesuré la sécrétion par des explants placentaires des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, le TNF- α , l'IL-1 β , le MCP-1, la leptine et anti-inflammatoires telles que l'IL-10. De manière surprenante, nous avons mis en évidence une diminution de la sécrétion des **cytokines IL-6**, et dans une moindre mesure, IL-10, MCP-1 et IL-1 β par les placentas issus de femme obèse par comparaison avec les placentas de femmes normo-pondérées. Par la suite, nous avons étudié l'activation des voies de signalisation de l'inflammation potentiellement stimulées par ces cytokines. Nous avons mis en évidence une hausse de l'activation de la **voie des MAPK** dans les placentas de femmes obèses. Nous n'avons en revanche observé aucun effet de l'obésité sur la l'activation des voies SPAK/JNK et JAK2. Parallèlement, nous avons étudié les populations de cellules

immunitaires (source de production des cytokines pro- et anti inflammatoires) présentes dans le tissu placentaire en comparant les placentas issus de femmes obèses et de femmes normo-pondérées. Nous avons mis en évidence une diminution du nombre de **monocyte-macrophages et de leucocytes** (incluant LT et LB) dans le groupe obèse comparé au groupe contrôle. Enfin, nous avons mesuré l'expression des ARNm des transporteurs de nutriments d'une part sur des biopsies placentaires et d'autre part, sur des cultures primaires de trophoblastes issus de femmes obèses et normo-pondérées. Nous avons mis en évidence une diminution de l'expression des **transporteurs GLUT1, LAT1, 2 et SNAT1, 2** dans les placentas de femmes obèses spécifiquement sur la face fœtale. Nous avons confirmé cette diminution pour les transporteurs *LAT1* and *SNAT1* dans les trophoblastes isolés à partir de placentas de femmes obèses. De plus, nous avons observés cette diminution de l'expression protéique de GLUT1 et SNAT1. Néanmoins, la mesure de l'activité des transporteurs (par la perfusion placentaire) ne montre pas d'effet significatif de l'obésité maternelle sur le passage des acides aminés.

Par ailleurs, la fonction d'échange dans le placenta est intimement liée à la structure des villosités placentaires. Nous avons donc étudié la biométrie des placentas de femmes obèses et des femmes normo-pondérées. Les mesures de surfaces et de volumes des composants structuraux placentaires n'ont pas mis en évidence de différences significatives entre les placentas issus de nos deux populations. Cependant, un marquage immunohistochimique des cellules endothéliales a révélé une diminution de la **densité des vaisseaux fœtaux** dans les placentas de femme obèses comparés aux contrôles. Enfin, nous avons mis en évidence que la production d'hCG et l'expression du gène de la leptine sont diminués dans les placentas de femmes obèses comparés au groupe contrôle.

Discussion

Cette étude nous a permis de mettre en évidence, sur une population homogène, bien caractérisée et sans complication de grossesse, que l'obésité maternelle conduit à une

diminution i) du statut inflammatoire ii) du transport des nutriments, iii) du nombre de vaisseaux fœtaux et iv) de la fonction endocrine dans le placenta humain à terme. En revanche, le poids de naissance des nouveau-nés n'est pas altéré par l'obésité maternelle.

Plus précisément, l'obésité maternelle induit une diminution de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires placentaires (IL-6, IL-1 β et MCP-1). Cette moindre production cytokiniques pourrait s'expliquer par une diminution de l'infiltration des cellules immunitaires que nous avons observées dans les placentas de femmes obèses. De plus, cette baisse de l'expression des cytokines placentaires observée au cours de l'obésité maternelle pourrait être due à des régulations épigénétiques telles que la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones. En effet, nous avons mis en évidence au laboratoire que l'obésité maternelle induit des modifications épigénétiques du promoteur de la leptine (Article 2). De plus, nous avons également démontré que la fonction endocrine reflétée par la production d'hCG et de leptine est diminuée dans un contexte d'obésité maternelle. L'hCG et la leptine sont deux hormones placentaires activement impliquées dans la croissance et le développement de l'unité fœto-placentaire. La diminution de la production de ces deux hormones observée dans cette étude pourrait conduire à des altérations du développement placentaire. Par ailleurs, nous avons observé dans cette étude une plus faible densité des vaisseaux fœtaux suggérant une altération de l'angiogenèse. Cette altération pourrait conduire à des défauts dans les échanges de gaz/nutriments dans l'espace intervilloux.

Enfin, nous avons mis en évidence dans cette étude une diminution de l'expression des transporteurs GLUTs, LATs et SNATs (ARNm et protéines). La leptine et l'IL-6 sont connues pour stimuler l'activité des SNATs dans les trophoblastes humains *in vitro*. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que la faible expression des transporteurs placentaires chez les femmes obèses soit associée à la baisse de la sécrétion des cytokines placentaires (IL-6 et leptine). Nos résultats appuient l'hypothèse selon laquelle le placenta adapte ses capacités de transport en fonction des signaux nutritionnels de la mère et du fœtus, afin d'établir un équilibre entre la demande fœtale et maternelle.

Ainsi, nos données suggèrent que, lorsqu'il est exposé à un environnement délétère hyper-

inflammatoire tel que l'obésité maternelle, le placenta présente un certain degré de plasticité et s'adapte en limitant la production locale de cytokines pro-inflammatoires. De plus, nous avons observé une diminution de de la densité des vaisseaux fœtaux et de l'expression des transporteurs de nutriments dans les placentas de femmes obèses. Ces adaptations placentaires pourraient constituer un mécanisme de protection permettant de maintenir les fonctions trophoblastiques et la croissance fœtale.

1 **Title: Maternal obesity alters placental nutrient transport associated with**
2 **inflammatory status and morphology modifications in human term placenta**

3 Authors: Perrine Nogues¹, Esther Dos Santos^{1,2}, Anne Tarrade⁴, Paul Berveiller^{1,5},
4 Lucie Arnould¹, Stanislas Grassin-Delyle³, François Vialard^{1,6}, Marie-Noëlle
5 Dieudonné^{1*}

6

7 **Authors' email addresses:** perrine.nogues2@uvsq.fr; esther.dos-santos@uvsq.fr;
8 anne.couturier-tarrade@inra.fr; paul.berveiller@uvsq.fr; lucie.arnould@uvsq.fr;
9 stanislas.grassin-delyle@uvsq.fr; francois.vialard@uvsq.fr; marie-
10 noelle.dieudonne@uvsq.fr.

11

12 **Affiliation:** ¹ GIG-EA 7404, Université de Versailles Saint Quentin en Yvelines,
13 Université Paris Saclay, Unité de Formation et de Recherche Simone Veil-Santé,
14 Montigny le Bretonneux, France.

15 ² Service de Biologie Médicale, Centre Hospitalier de Poissy-Saint-Germain, Poissy,
16 France.

17 ³INSERM UMR1173, Université Versailles Saint Quentin en Yvelines, Université Paris
18 Saclay, Unité de Formation et de Recherche des Sciences de la Santé Simone Veil,
19 Montigny le Bretonneux, France.

20 ⁴ UMR BDR, INRA, ENVA, Université Paris Saclay, Jouy en Josas, France

21 ⁵ Service de Gynécologie-Obstétrique, Centre Hospitalier de Poissy-Saint-Germain-
22 en-Laye, Poissy, France.

23 ⁶Département de Biologie de la Reproduction, Cytogénétique, Gynécologie et
24 Obstétrique, Centre Hospitalier de Poissy-Saint-Germain-en-Laye, Poissy, France.

25 *Correspondence: Marie-Noëlle Dieudonné, EA 7404, Gamètes - Implantation -
26 Gestation, 2 avenue de la Source le Bièvre, UFR des Sciences de la Santé Simone
27 Veil, 78180 Montigny-le-Bretonneux, France
28 E-mail: marie-noelle.dieudonne@uvsq.fr

29

30 **Abstract**

31 Maternal obesity is becoming increasingly prevalent, and is associated with elevated
32 maternal and fetal morbidity and mortality rates. As the interface between maternal
33 and fetal compartments, the placenta has a major role in dictating the impact of
34 maternal health on fetal development during pregnancy. It is well established that
35 maternal obesity is characterized by systemic inflammation and excess fuel. However,
36 the impact of maternal obesity on the placenta's structure and function (i.e. nutrient
37 transport, and hormone and cytokine production) is still subject of debate. We therefore
38 hypothesized that maternal obesity is associated with morphologic, secretory and
39 nutrient-related changes and elevated levels of inflammation in the placenta.

40 We collected samples of placental tissue from two well-defined groups of pregnant
41 women: a group of 29 obese women, and a control group of 36 non-obese women.
42 None of the women had gestational diabetes. We compared the two groups with regard
43 to placental cytokine and hormone secretion, immune cell content, morphology, and
44 nutrient transporter expressions.

45 In contrast to our starting hypothesis, we observed that maternal obesity was
46 associated with (i) lower placental IL-6 expression and macrophage/leukocyte
47 infiltration, (ii) lower placental expression of GLUT1, LAT1-2, and SNAT1-2, (iii) a lower
48 vessel density in the placenta, and (iv) lower levels of placental leptin and hCG
49 production. Maternal obesity did not appear to influence the birthweight. Overall, these

50 differences appear to reflect the placenta's adaptive response to the harmful maternal
51 environment, in order to optimize fetal growth.

52

53 **Introduction**

54 Obesity is one of the greatest public health challenges of the 21st century. Since 1980,
55 the prevalence of obesity (defined as a body mass index (BMI) ≥ 30 kg/m²) has doubled
56 in over 70 countries and has steadily increased in most others [1]. It has been
57 estimated that over 340 million children and adolescents (aged 5 to 19) worldwide are
58 now overweight or obese – corresponding to a prevalence of 18% in this age group
59 [2]. Unsurprising, the prevalence of obesity during pregnancy (maternal obesity) is also
60 rising. In 2011-12, the estimated prevalence of obesity in women aged 20-39 in the
61 United States was 31.8% [3]. Maternal obesity is an important risk factor for adverse
62 health outcomes in both the mother and the child. Perinatal risks include preeclampsia,
63 gestational diabetes mellitus (GD), gestational hypertension, fetal macrosomia, and (to
64 a less extent) fetal intrauterine growth restriction [4]. Furthermore, maternal obesity is
65 associated with an elevated risk to the child of metabolic and cardiovascular disease
66 in childhood and adulthood, including obesity, type 2 diabetes mellitus, and metabolic
67 syndrome [5–7].

68 The relationship between maternal health and fetal development is closely linked to
69 the placenta, which constitutes the primary site for maternal-fetal exchange. The
70 chorionic villus is the human placenta's structural and functional unit. The
71 syncytiotrophoblast (a highly specialized multinucleated epithelial cell layer covering
72 the surface of the chorionic villi) has several functions: (i) it forms a physical and
73 immune barrier between the maternal and fetal circulations, (ii) it produces a multitude
74 of hormones, such as human chorionic gonadotropin (hCG) and leptin, and (iii) it

75 mediates nutrient transport [8]. The latter factor depends on the placenta's size, its
76 shape (the tissue thickness, and the surface area for exchange), nutrient transporter
77 activity/availability, and the utero- and feto-placental blood flows [9]. More particularly,
78 glucose crosses the placenta by facilitated diffusion through at least two major
79 transporter isoforms (GLUT1 and GLUT3) that are highly expressed in human term
80 placenta [10,11]. Furthermore, active transport of amino acids across the placenta
81 occurs through two main isoforms of the system L sodium-independent neutral amino
82 acid transporter (LAT1 and LAT2) [12,13] and three main isoforms of the system A
83 sodium-dependent neutral amino acid transporter (SNAT1, SNAT2, and SNAT4); all
84 five isoforms are highly expressed in the human term placenta [14–16]. Changes in
85 the expression of placental nutrient transporters (for glucose and amino acids, in
86 particular) have been described in obese women. Indeed, fetal weight at birth is
87 positively correlated with placental GLUT1 protein expression and activity in obese
88 patients compared to healthy weight patients [17]. Concerning the amino acid
89 transporters, one study found that LAT expression and activity on isolated microvillous
90 membrane vesicles were not correlated with maternal obesity [18]. However, another
91 study demonstrated clearly that maternal obesity was associated with significantly
92 lower placental expression and activity for SNAT4 but not for SNAT1 and SNAT2 [19].
93 Furthermore, obesity was associated with lower placental activity of the taurine
94 transporter TauT, which transfers the β -amino acid taurine, involved in fetal growth and
95 organogenesis [20]. Taken as a whole, these results suggest that the maternal
96 environment can influence the placental transport of nutrients.

97 Maternal obesity is characterized by chronic, low-grade inflammation, resulting in
98 elevated circulating levels of pro-inflammatory cytokines; these include interleukins-1
99 and 6 (IL-1 and 6), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), monocyte chemoattractant

100 protein 1 (MCP-1), C-reactive protein (CRP), and leptin [21,22]. In parallel,
101 exacerbated inflammation and uncontrolled lipotoxicity have been observed in
102 placental samples from obese women [23,24]. More precisely, two studies have
103 reported that placental macrophage and leukocyte counts are abnormally high in
104 obese women. The cell phenotypes are heterogeneous, with complex subsets of
105 resident CD14⁺, CD68⁺, and CD45⁺ cells, respectively [25,26]. Moreover, the placental
106 mRNA expression of pro-inflammatory mediators (i.e. IL-1, TNF- α and IL-6) was
107 abnormally high in obese women [26]. Furthermore, Saben *et al.* demonstrated that
108 maternal obesity promoted lipid accumulation and oxidative stress (as reflected by NF-
109 κ B activation) in placenta samples [24]. In contrast, other researchers did not find any
110 significant differences in the placental mRNA expression of pro-inflammatory cytokines
111 and in placental immune cell populations between obese and non-obese groups
112 [23,27]. It is well established that immune status (cell population and mediator levels)
113 has a pivotal role in placental functions throughout pregnancy [28]; hence, uncontrolled
114 inflammation could influence placental development [29].

115 Various datasets suggest that maternal obesity is associated with changes in placental
116 function and structure – changes that are likely to affect fetal growth and development.
117 Histologic studies of the placenta have shown clearly that maternal obesity is
118 associated with (i) hyperplasia of the smooth muscle in the placental vessel walls, and
119 (ii) immaturity of the placental villous tree, as characterized by a large villus diameter
120 and abnormal angiogenesis (a low CD34⁺ cell count in the capillary endothelium)
121 [23,25].

122 Thus, the placenta's immune and inflammatory status and its cellular and molecular
123 responses to a harmful maternal environment during pregnancy have yet to be
124 extensively characterized, and conflicting results have even been reported for some

125 aspects. In this context, the objective of the present study was to evaluate the effect of
126 maternal obesity (as characterized by chronic inflammation) on the placenta's
127 inflammatory status, morphology, and levels of nutrient transporter expression and
128 activity.

129

130 **Materials and Methods**

131 *Materials*

132 RNA stabilization solution (RNAlater) was purchased from Qiagen (Hilden, Germany).
133 The Nucleospin RNA II kit was obtained from Macherey-Nagel (Düren, Germany).
134 Superscript II RNase H-RT, primers and NovexWedgeWellTM 4-20% Tris-Glycine gel
135 were from Invitrogen (Carlsbad, USA), and RNase inhibitor was sourced from
136 AMRESCO (Solon, USA). DyNAmoColorFlash SYBR Green, LC-MS-grade methanol,
137 acetonitrile, the SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate detection kit,
138 water, and ammonium formate were from Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA).
139 Earle's balanced salts/magnesium sulfate was purchased from United States
140 Biological (Salem, USA). Protease-free bovine albumin serum solution (30%) was from
141 H2B (Limoges, France). Penicillin/streptomycin, L-valine ($C_5H_{11}NO_2$; monoisotopic
142 mass: 117.079 g/mol), L-alanine ($C_3H_7NO_2$; monoisotopic mass: 89.048 g/mol), 3-O-
143 methyl-D-glucopyranose, antipyrine, the internal standard (IS) tranexamic acid
144 ($C_8H_{15}NO_2$; monoisotopic mass: 157.11 g/mol) and LC-MS-grade formic acid, were
145 from Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA). Percoll™ PLUS was obtained from GE
146 Healthcare (Chicago, USA). Dulbecco's modified Eagles' medium (DMEM) high-
147 glucose and fetal calf serum (FCS) were purchased from Gibco, Fisher Scientific
148 (Waltham, USA). Collagen type-I was obtained from BD Biosciences (Bedford, USA).
149 The detection kit Iview-DAB (760-091), the monoclonal rabbit anti-CD14 (clone

150 EPR3653, 760-4523) and the monoclonal rabbit anti-CD31 (clone JC70, 760-4378)
151 antibodies were obtained from Roche-Ventana (Oro Valley, USA). Monoclonal mouse
152 anti-CD34 (clone QBend10, F/134M-14) antibody was sourced from MMFrance
153 (Brignais, France). Monoclonal mouse anti-CD68 (clone KP1, PDM066) was obtained
154 from DE Clinisciences (Nanterre, France). Monoclonal mouse anti-CD45 (clone
155 2B11+PD7/26) was obtained from Dako (Santa Clara, USA). The suppliers of the
156 antibodies used in the immunoblot experiments are listed in Table 1. U-PLEX Metabolic
157 Group 1 (Human) multiplex assays were purchased from Meso Scale Discovery
158 (Rockville, USA).

159

160 *Patients*

161 Women aged between 27 and 37, with a singleton pregnancy, no complications of
162 pregnancy (such as pre-GD or GD) were enrolled after the provision of written,
163 informed consent. The main inclusion criterion was a first-trimester BMI of 18-25 kg/m²
164 for the non-obese (control) group and 30-40 kg/m² for the obese group. Samples of
165 peripheral blood and placenta were collected from 65 women (36 non-obese women
166 and 29 obese women) undergoing elective caesarean delivery after 38 to 41 weeks of
167 amenorrhea. Screening for pre-GD and GD was based on international and French
168 national guidelines. Women with a high risk of GD generally have a personal or family
169 (first-degree) history of diabetes, a history of GD or fetal macrosomia in a previous
170 pregnancy, and a body mass index (BMI) >25 kg/m² [30]. The screening protocol also
171 included a fasting blood glucose (FBG) assay during the first trimester of pregnancy.
172 Gestational diabetes was defined according to the thresholds published by the
173 International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups [31]. During the
174 first trimester of pregnancy, women with an FBG level of 5.1 mmol/L (92 mg/dL) or

175 more but less than 7.0 mmol/L (126 mg/dL) were considered to have GD. Women with
176 an FBG level of 7.0 mmol/L or more were considered to have preexisting (pre-
177 pregnancy) diabetes. If the FBG level was normal, a 75 g oral glucose tolerance test
178 was performed at between 24-28 weeks. In the test, women with an FBG level of 5.1
179 mmol/L or more and plasma glucose concentration values of around 10 mmol/L (180
180 mg/dL) at 1 h and around 8.5 mmol/L (153 mg/dL) at 2 h were also considered to have
181 GD. All women with one or more above-normal measurements were considered to
182 have GD, and were treated according to the same protocol. Whenever GD was
183 diagnosed, women were referred to our diabetology department for medical care.

184

185 *Placenta tissue sampling*

186 Within 15 minutes of caesarean section performed by experienced clinicians, tissue
187 was sampled from both the fetal and maternal sides of the placenta. The fetal side
188 consisted of intervillous tissues and chorionic villi. The maternal side consisted mainly
189 of fetal villous tissue but also contained some maternal tissue (decidual basalis).
190 Whenever possible, the analyses were performed independently on maternal- and
191 fetal-side samples.

192

193 *Third-trimester placental explant culture*

194 Placental tissues from control and obese women were placed in saline solution (NaCl
195 150 mM), washed, and dissected in DMEM high-glucose (4.5 g/L) supplemented with
196 1% penicillin/streptomycin and 10% FCS. Pieces of villous tissue (diameter: 2×2 mm)
197 were then cultured in 12-well collagen-I-coated plates. Placental samples were
198 cultured at 37°C for 2h in a 5% CO₂ and 95% air atmosphere prior to the addition of

199 DMEM high-glucose supplemented with 1% penicillin/streptomycin and 1% FCS, for
200 72 h. Cell culture media were collected after 24 h, 48 h and 72 h.

201

202 *Multiplex ELISAs*

203 The cytokine profile of placental tissue samples from the control and obese groups was
204 studied using the U-plex metabolic multiplex assay (Meso Scale Discovery) and
205 supernatant from a 48 h placental explant culture, according to the manufacturer's
206 instructions. Briefly, the plate was coated overnight at 4°C with linkers combined with
207 primary antibodies against IL-10, IL-1 β , IL-6, leptin, MCP-1, and TNF- α . The plate was
208 washed three times. Standards and samples were then added in duplicate, and
209 incubated for 2 h at room temperature. The plate was washed three times, and
210 secondary antibodies were added to each well and incubated for 1 h at room
211 temperature. Lastly, cytokine concentrations were measured using a MESO QuickPlex
212 SQ 120 instrument, and the results were analyzed with MSD Discovery Workbench
213 software (Meso Scale Discovery).

214

215 *Trophoblast isolation and culture*

216 Placental cells were isolated according to Kliman et al.'s method [32], with a few
217 modifications. Approximately 25-35 g of villous tissue were washed in medium (to
218 remove excess blood) and then dissected in Hank's balanced salt solution 1X (HBSS
219 1X). The minced tissue was digested once for 30 min in a digestion solution (HBSS
220 1X, trypsin 0.2%, MgCl₂ and CaCl₂ 0.1mM, DNAse 50,000 IU, pH 7.4). Next, the tissue
221 was digested six to eight times for 10 min, and washed five times in HBSS 1X
222 supplemented with 0.1% penicillin-streptomycin. All the supernatants collected were
223 centrifuged for 10 min at 200 \times g, and cells were purified on a 20-55% Percoll

224 concentration gradient. Cells were cultured in phenol-red-free DMEM high-glucose (4.5
225 g/L) supplemented with 1% penicillin/streptomycin and 10% FCS at 37°C in a 5% CO₂
226 and 95% air atmosphere. Cells were washed after 24 h of culture, and then cultured
227 for an additional 48 h in DMEM high-glucose supplemented with 1%
228 penicillin/streptomycin and 1% FCS at 37°C in a 5% CO₂ and 95% air atmosphere.

229

230 *Placental perfusion*

231 Placental samples collected after cesarean delivery were subsequently perfused in an
232 open, double circuit, according to a validated method [33,34]. On average, the
233 perfusion experiments were started within 45 min of delivery. After a visual confirmation
234 of vascular and tissue integrity on both the maternal and fetal sides, a distal branch of
235 fetal artery and its associated vein (supplying a peripheral cotyledon) were cannulated.
236 The placenta was perfused with Earle's balanced salts/magnesium sulfate medium
237 (8.83 g/L) supplemented with bovine albumin (25 g/L), and maintained at 37°C. The
238 fetal circulation was established at a flow rate of 6 ml/min using a peristaltic pump, and
239 the flow was monitored for 5 min before the start of the perfusion. The perfusion was
240 initiated by the insertion of a catheter into the intervillous space on the maternal side.
241 The maternal circulation was established at a flow rate of 12 ml/min, using the same
242 peristaltic pump. The pHs of the maternal and fetal compartments were adjusted to 7.4
243 and 7.2, respectively. To ensure the validity of the experimental conditions, the pH,
244 flow balance, and potential fluid leakage from the fetal circuit were monitored regularly.
245 Given that the fetal artery pressure (induced by the peristaltic pump) was known, if the
246 balance of flows was found incorrect, the procedure was discontinued. If not, the
247 perfusion was pursued if the balance of flows was found correct. The maternal circuit
248 was monitored by measuring the same parameters.

249 At the beginning of the experimental period, antipyrine (20 mg/L, a freely diffusing
250 marker), L-alanine (0.34 mg/L), L-valine (0.14 mg/L) [35] and 3-O-methylglucose (0.2
251 g/L) were added to the maternal medium. Transplacental transfer of amino acids and
252 3-O-methylglucose into the fetal circulation was measured over 90 minutes; this
253 duration is usually long enough to measure the time course. Samples from the
254 maternal reservoir were subsequently collected at 0, 30, 60, 90 min, whereas samples
255 from fetal circuit were collected every 5 min. Antipyrine, amino-acid and 3-O-
256 methylglucose concentrations were measured using an LC-MS/MS system (see
257 below).

258 At the end of the perfusion, the cotyledon was rinsed with cold HBSS 1X solution for
259 10 min and frozen at -80°C until use, as necessary.

260

261 *LC-MS/MS system and analysis procedure*

262 Chromatography was performed with an UltiMate 3000 Quaternary Rapid Separation
263 Pump (Thermo Scientific Dionex, Villebon, France), using a 1.7 µm Acquity UPLC BEH
264 HILIC column (100 x 2.1 mm internal diameter) (Waters, Guyancourt, France)
265 maintained at 40°C in an UltiMate 3000 Rapid Separation Thermostated Column
266 Compartment. Five microliters were injected into the chromatography system using an
267 UltiMate 3000 Rapid Separation Autosampler, with a sample stack maintained at +8°C.
268 The following mobile phases were used: acetonitrile, water, and 200 mM aqueous
269 ammonium formate adjusted to pH 3 with formic acid. The gradient is described in the
270 supplemental data (Table S1). The flow rate was 500 µl/min, and total run time was 16
271 min. The LC parameters were optimized for speed and sensitivity. Compounds were
272 ionized with a heated electrospray ionization source and detected with a triple
273 quadrupole Quantiva mass spectrometer (Thermo Fisher), using multiple reaction

274 monitoring. Nitrogen (N2-45 nitrogen generator, VWR International, Fontenay sous
275 Bois, France) was employed as the sheath, and auxiliary gas and argon (Messer,
276 Puteaux, France) was used as the collision gas. The electrospray source operated in
277 positive ionization mode. Instrument parameters were optimized by using a continuous
278 20 µl/min infusion of amino acids (1 mg/L in mobile phase). Data acquisition and
279 processing was performed using Chromeleon software (version 6.80, Thermo
280 Scientific Dionex) and Xcalibur software (version 3.0.63, Thermo Fisher).

281

282 *Working, calibration standard and quality control solutions for LC-MS/MS analysis*

283 Stock solutions of amino acids and internal standard (IS: 1 g/L) were prepared in a
284 mixture of methanol and water (50/50). Working solutions of amino acids for calibration
285 standards (CSs) were prepared by diluting the stock solution in methanol. A working
286 solution of IS (5000 ng/ml) was obtained by diluting the stock solution in methanol.
287 Calibration standards were prepared by spiking 50 µl of blank matrix (Earle's balanced
288 salts/magnesium sulfate medium and 1/12 bovine serum albumin solution) with 5 µl of
289 the appropriate working solution. Quality control samples were also prepared in blank
290 matrix by using working solutions for standard calibrations: 8 µl of working solution
291 were used (S3, S5 and S7 were used to prepare CQ1, CQ2 and CQ3, respectively).
292 All the concentrations are described in the Supplemental Data, Table S2a-c. Earle's
293 balanced salts/magnesium sulfate medium and bovine serum albumin were stored at
294 4°C, and stock and working solutions were stored at -20°C.

295

296 *Sample preparation for LC-MS/MS analysis*

297 Samples were stored at -20°C, thawed for analysis, and mixed, and aliquoted (50 µl)
298 into an Eppendorf tube to which 5 µl of IS working solution and 500 µl of 10% formic

299 acid in acetonitrile were then added. The samples were mixed, stored at 4°C for 10
300 min, and centrifuged at 13000×g for 10 min. Next, 450 µl of the supernatant layer were
301 dispensed into a new Eppendorf and evaporated under vacuum (using a SpeedVac)
302 for 40 min at 43°C. Thirty microliters of mobile phase (10:90 - water containing 200 mM
303 ammonium formate adjusted to pH 3, and acetonitrile) were added. Samples were
304 mixed and filtered using ZipTip C18 pipette tips (Merck, Darmstadt, Germany) for LC-
305 MS/MS analysis.

306

307 *Total RNA extraction and reverse transcription*

308 Human term placental biopsies were collected, placed in RNA stabilization solution,
309 and stored at -80°C until use. Around 30 to 40 mg of placental tissue (from the fetal
310 and maternal sides, separately) were disrupted in RNeasy lysis buffer. Total RNA was
311 then extracted using the RNeasy kit, according to the manufacturer's instructions. The
312 quantity and quality of the extracted RNA were measured using an Infinite M200
313 system (Tecan, Männedorf, Switzerland). Total RNA was stored at -80°C until use. The
314 same RNA extraction procedure was used for cell cultures. Subsequently, 1 µg (tissue)
315 or 0.05 µg (cells) of total RNA was reverse-transcribed into complementary DNA
316 (cDNA) using random primers. An aliquot of sample was always incubated in the
317 absence of reverse transcriptase, to control for possible contamination by genomic
318 DNA. The cDNA was stored at -20°C until use.

319

320 *Real-time PCR*

321 Quantitative PCRs were performed using a CFX96 real-time system (BioRad,
322 Hercules, CA) and the primer sets indicated in Table 2. The second derivative
323 maximum method was used to automatically determine the crossing point (Cp) for

324 individual samples. The three reference genes (coding for ribosomal protein L13A,
325 TATA-binding protein, and B2-microglobulin) were tested for stable expression. In
326 each sample, the concentration ratios (target mRNA/three reference mRNAs) were
327 calculated using CFX Manager Software (version 3.0, BioRad, Hercules, CA) and then
328 expressed in arbitrary units as a percentage of the control value. Calibration curves
329 were log-linear over the quantification range, with correlation coefficients (r^2) >0.99 and
330 efficiencies ranging from 1.8 to 2. The intra-assay variability of duplicate Cp values
331 never exceeded 0.2 cycles, and the inter-assay variability (coefficient of variation)
332 ranged from 1.9% to 4.1% for 8 to 10 runs of each transcript.

333

334 *Immunoblotting*

335 Equal amounts of human term placental biopsies (200 mg) were lysed on ice in buffer
336 containing 20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 1% Nonidet P40, 1% glycerol, 1
337 mM sodium-orthovanadate, 30 mM beta-glycerophosphate, 100 µg/ml 4-(2-aminoethyl)
338 benzenesulfonyl fluoride hydrochloride, and a cocktail of anti-proteases and anti-
339 phosphatases (5 µg/ml aprotinin, 12.5 µg/ml leupeptin, and 10 mM NaF). Next, the
340 lysates were centrifuged at 10000 × g for 20 min at 4°C. The supernatant was collected,
341 and the protein concentration was measured in a Bradford assay using bovine serum
342 albumin as the standard. The supernatant was then diluted in Laemmli buffer (1:1).
343 Each protein extract (20 µg) underwent SDS-PAGE gel electrophoresis (4-20% Tris-
344 glycine). The proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane, and blocked
345 in Tris-buffered saline Tween 20 1X buffer (20 mM Tris, 137 mM NaCl and 0.1% Tween
346 20) with 2.5% gelatin or 5% milk for 2 h or 1 h, respectively. Next, the membranes were
347 incubated overnight with the primary antibodies listed in Table 2. The data were
348 analyzed using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, USA).

349

350 *Immunohistochemistry*

351 The inflammation status of placental sections was determined with regard to CD14, (a
352 lipopolysaccharide receptor and a marker for Hofbauer macrophages), CD68
353 (expressed by macrophages and monocytes), and CD45 (a marker for leucocytes
354 including T-lymphocytes and, to a lesser extent, B-lymphocytes). To villous tree's
355 stromal and vascular pattern was determined by immunostaining for CD34, and the
356 vessel density was quantified by staining capillary endothelial cells and embryonic
357 fibroblasts for CD31. Placentas were fixed in 4% paraformaldehyde, dehydrated, and
358 embedded in paraffin. Next, sections of placental tissue (thickness: 5 µm) were
359 prepared in the vertical plane (from the maternal side to the fetal). The incubation and
360 revelation steps were performed with an iView-DAB detection kit (760-091) and an
361 automatized device (BenchMark® XT, Roche, Oro Valley, USA), according to the
362 respective manufacturers' instructions. Briefly, the antigen on all slides was revealed
363 with a CC1 standard in an automatized procedure lasting 60 min for CD14 and CD34
364 and 32 min for CD45 and CD68. Next, the slides were incubated with a primary
365 monoclonal rabbit anti-CD14 antibody (clone EPR3653, ready-to-use) and a primary
366 monoclonal mouse anti-CD34 (clone QBend10, diluted 1:100) for 32 min, a primary
367 monoclonal mouse anti-CD68 (clone KP1, ready-to-use) for 24 min, or a primary
368 monoclonal mouse anti-CD45 (clone 2B11+PD7/26, 1:400) antibody were incubated
369 for 28 min. Digital images of DAB-stained slides were acquired at magnification of ×20,
370 using a whole-slide scanner (AperioScanScope AT2, Leica Biosystems, Germany).
371 Specific immunostaining was quantified using the positive pixel count algorithm in
372 AperioImageScope software (version 12.3.3, Leica Biosystems).

373

374 *Stereological analysis*

375 Placental tissue was fixed in 4% paraformaldehyde, dehydrated, and embedded in
376 paraffin. Again, sections of placental tissue (thickness: 5 μm) were prepared in the
377 vertical plane (from the maternal side to the fetal). The sections were stained with
378 hematoxylin-eosin reagent in an automatized device (BenchMark[®] XT, Roche). To
379 produce full panoramic views, the slides were scanned using the Nanozoomer Digital
380 Pathology system (NDP Scan U10074-01, Hamamatsu, Japan). The total volumes of
381 the placenta and its compartments (i.e. trophoblasts, mesenchyme, and vessels) were
382 determined using Cavalieri's method, as implemented in Mercator[®] software [36].
383 Each compartment was carefully outlined by hand. Volumes and surface areas of all
384 compartments were then quantified using one-stop stereology and Mercator[®] software
385 [37].

386

387 *Statistical analysis*

388 The data were not normally distributed, and so non-parametric tests were used. All
389 values were expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM), with the
390 exception of the maternal and neonatal clinical characteristics, the blood lipid levels,
391 and the inflammatory profiles (were expressed as the mean \pm standard deviation (SD)).
392 Intergroup differences in clinical characteristics were probed using a Mann-Whitney
393 test. Wilcoxon's matched-pair test or a Mann-Whitney test were used for to compare
394 tissue and cell mRNA and protein expression levels, cytokine concentrations, and the
395 stereologic analysis in the control vs. obese groups. The Kruskal-Wallis test was used
396 to assess the placental perfusion experiments. All statistical analyses were performed
397 with GraphPad Prism software (version 5.0, GraphPad, La Jolla, USA).

398

399

400 **Results**

401 *Maternal and neonatal clinical characteristics*

402 Between January 2017 and April 2019, 65 women met all the inclusion criteria (see the
403 Methods section) and were included in the study (Table 3).

404 All had a singleton pregnancy, and none had any complications of pregnancy. The BMI
405 criterion enabled us to define a control group (mean \pm SD BMI = 22 ± 2.8 kg/m²) and
406 an obese group (BMI = 37 ± 4.5 kg/m²; $p < 0.0001$).

407 The study population was homogeneous with regard to the demographic parameters,
408 since there were no significant intergroup differences in ethnicity, maternal age, or
409 maternal height at delivery. Furthermore, the placental dimensions (weight, length, and
410 width) were similar in the control and obese groups. We did not observe any significant
411 intergroup differences in birthweight or placental weight, although the
412 birthweight/placental weight ratio (corresponding to placental efficiency) was
413 significantly lower in the obese group than in the control group. However, a sex-specific
414 analysis reveal that the birthweight/placental weight ratio was only lower in the obese
415 group for female infants. In summary, the control and obese groups did not differ
416 markedly with regard to maternal characteristics. However, the birthweight/placental
417 weight ratio was significantly lower in the obese group, due to a difference for female
418 infants only.

419 Maternal serum levels of lipids (total cholesterol, triglycerides, high-density lipoprotein,
420 and low-density lipoprotein), inflammatory markers (haptoglobin, orosomuroid, CRP),
421 and glucose are listed in Table 4. There were no significant intergroup differences in
422 the haptoglobin, orosomuroid, triglyceride, low-density lipoprotein, and glucose levels.
423 However, we observed higher CRP levels and lower high-density lipoprotein levels in
424 the obese group, relative to the control group.

425

426 *Association between obesity and the inflammatory state in human third-trimester*
427 *placenta*

428 The cytokine secretion profile of supernatant from placental explants was analyzed in
429 multiplex ELISA. As shown in Figure 1A-B, the secreted levels of TNF- α and leptin in
430 the obese and control groups were similar. In contrast, secreted IL-6 levels was
431 significantly lower in the obese group than the control group. Secreted levels of IL-10,
432 MCP-1 and IL-1 β were also lower in the obese group than in the control group,
433 although these intergroup differences were not statistically significant (Figure 1C-F). In
434 summary, obesity appeared to be associated with lower secretion of pro-inflammatory
435 cytokines by the placenta.

436 We next studied the activation of downstream signaling pathways by pro-inflammatory
437 cytokines in placental homogenates, by focusing on levels of total and phosphorylated
438 SAPK/JNK, ERK1/2, and JAK2. The level of SAPK/JNK phosphorylation was similar
439 in the control and obese groups, and a regression analysis did not reveal any
440 correlation between the maternal BMI and the expression of the phosphorylated form
441 (Figure 2A and 2C). However, we observed significantly greater expression of the
442 phosphorylated ERK1/2 protein in the obese group than in the control group, and the
443 level was significantly correlated with the maternal BMI (Figure 2A and 2D). Lastly,
444 phosphorylated JAK2 protein was not detected in either of the two groups. There were
445 no intergroup differences in total levels of SAPK/JNK, ERK1/2 or JAK2 proteins (Figure
446 2B). In a regression analysis, total SAPK/JNK, ERK1/2, and JAK2 levels were not
447 correlated with the maternal BMI (Figure 2E-G).

448 In parallel, immune cell populations were studied immunohistochemically in full-
449 thickness sections of term placenta. Hofbauer cells, leukocytes (including T-

450 lymphocytes and B-lymphocytes), and monocytes-macrophages were detected by
451 immunostaining for CD14, CD45, and CD68, respectively. Counts of CD45- and CD68-
452 positive cells in placental villi were significantly lower (by a factor of 0.3 and 0.4,
453 respectively) in the obese group than in the control group (Figure 3B-C). However, as
454 shown in Figure 3A, we did not observe an intergroup difference in the CD14-positive
455 cell count. In summary, obesity appears to be associated with lower secretion of pro-
456 inflammatory cytokines, lower immune cell counts, and increased activation of the
457 ERK1/2 pathways in placental tissue.

458

459 *Association between obesity and nutrient transport across the human third-trimester*
460 *placenta.*

461 Firstly, we measured the mRNA expression of nutrient transporters on the fetal and
462 maternal sides of human term placenta in the control and obese groups. The data
463 showed that *GLUT1*, *LAT1*, and *SNAT1-2* mRNA expressions were lower on the
464 maternal side than on the fetal side of the placenta in the control group but not in the
465 obese group (Figures 4A, 5A, 6A-B). Furthermore, *GLUT1*, *LAT1-2*, and *SNAT1-2*
466 mRNA levels on the fetal side were lower in the obese group than in the control group.
467 Next, we studied the mRNA expression of nutrient transporters in villous trophoblasts
468 isolated from human term placenta in the control and obese groups. There were no
469 intergroup differences in *GLUT1*, *LAT2*, and *SNAT2* mRNA expression levels (Figures
470 4D, 5D, and 6E). However, the mRNA expression levels of *LAT1* and *SNAT1* were
471 lower in the obese group than in the control group (Figures 5C and 6D).

472 Immunostaining of placental tissue (Figures 4C and 6C) highlighted lower GLUT1 and
473 SNAT1 protein expressions in the obese group than in the control group. Lastly,

474 *GLUT3* mRNA levels in placental tissue and isolated trophoblast cells were similar in
475 the two groups, under all conditions studied (Figure 4B, 4E).

476 In summary, our results clearly showed that obesity was associated with abnormally
477 low mRNA expression levels of nutrient transporters on the fetal side (but not the
478 maternal side) of human placenta. Moreover, placental GLUT1 and SNAT1 protein
479 expression levels were lower in the obese group than in the control group.

480 To measure the impact of maternal obesity on the efficiency of the nutrient transport,
481 we performed placental perfusion experiments. With regard to amino acid transport,
482 we did not observe any intergroup differences in the L-valine and L-alanine transport
483 across the placenta (Figure 7A-B).

484

485 *Associations between obesity and the morphologic and functional characteristics of*
486 *human third-trimester placenta*

487 Firstly, observations of the placenta samples under the microscope did not reveal any
488 intergroup differences in the presence of infarcts (data not shown). However, we
489 observed a greater frequency of focal subchorial thromboses in the obese group (5
490 placentas out of 10, 50%), than in the control group (2 out of 8, 25%). We also observed
491 a greater frequency of subchorial fibrin deposits in the obese group (5 placentas out of
492 10, 50%) than in the control group (1 out of 8, 12.5%).

493 Secondly, we used stereology to study structural components in the placenta samples
494 from the obese and control groups. There were no intergroup differences in the volume
495 and surface area for trophoblasts, fetal vessels, mesenchyme, sprouts/knots, fibrin,
496 and intervillous chamber components (Figure 8A-B). However, CD34 and CD31
497 immunostaining of full-thickness sections of term placenta showed that the vessel

498 density of the villous tree was significantly lower (by factor of 0.8 for both markers) in
499 the obese group than in the control group (Figure 8C-D).

500 Lastly, we analyzed the impact of maternal obesity on the placenta's endocrine
501 function (hCG secretion and leptin mRNA expression on isolated villous trophoblasts).
502 After 72 h of culture, low levels of hCG secretion (Figure 9A) and leptin mRNA
503 expression (Figure 9B) were observed in the obese group, relative to the control group.

504

505 **Discussion**

506 Worldwide, the prevalence of obesity is rising at an unprecedented rate. There is now
507 a wealth of evidence to show that early-life exposure to overnutrition is associated with
508 an elevated incidence of metabolic disease in adult life. During pregnancy, the placenta
509 not only relays the mother's metabolic environment to the fetus but can also become
510 a target, with an incidence on its major functions (such as nutrient supply and immune
511 protection). Some researchers have evidenced an impact of maternal obesity on the
512 placenta's development and its exchange functions. However, the literature data on
513 this aspect are disparate and subject of debate. One possible explanation for these
514 discrepancies relates on the heterogeneity of the study populations with regard to
515 lifestyle factors, eating habits, ethnicity, and the prevalence of complications of
516 pregnancy (such as GD). In this context, our study has several strengths. Firstly, we
517 analyzed four major placental characteristics (nutrient exchange, inflammatory status,
518 morphology, and endocrine function) in the same populations of obese and control
519 women. Secondly, we studied a highly well-characterized cohort of women who were
520 obese but did not suffer from GD or cardiovascular disease. Moreover, the ethnic
521 homogeneity of our population may have helped to avoid discrepancies and possible
522 confounding effects. Indeed, our population's homogeneity might explain why there

523 were relatively few differences in maternal and placental characteristics between the
524 obese and control groups in our study, relative to others. Concerning birthweight, our
525 results confirmed previous reports that this parameter was similar in GD-free obese
526 women and non-obese women [23,38–40]. However, our present results indicated that
527 placental efficiency (an index of the fetoplacental unit's development during
528 pregnancy) was lower in the obese group than in the control group. This was
529 particularly true for the female fetuses, as previously described in humans and in
530 mouse models [39–41]. Moreover, a recent study demonstrated that maternal obesity
531 is specifically associated with higher adiposity in female offspring, without affecting
532 birthweight [39]. Thus, our study is a further example of a sex-specific effect of maternal
533 obesity on female fetuses.

534 Normal pregnancy is characterized by changes in the inflammatory profile, relative to
535 non-pregnant women. A delicate inflammatory balance between pro- and anti-
536 inflammatory cytokines may be necessary for normal embryo implantation, trophoblast
537 invasion, and placentation. It is well known that obesity leads to a systemic pro-
538 inflammatory environment in obese non-pregnant women, and that this environment is
539 exacerbated in obese pregnant women. Our present results showed clearly that serum
540 CRP levels were higher in obese pregnant women than in non-obese pregnant women,
541 and confirmed the literature reports on a characteristic, elevated inflammatory state in
542 maternal obesity [26,38,42]. During pregnancy, the placenta is subjected to this pro-
543 inflammatory maternal environment. However, the effect of obesity on the placenta's
544 inflammatory status is still subject to debate. To the best of our knowledge, only the
545 placental mRNA expression of cytokines has been analyzed in obese women
546 [23,26,27,38]. The present study is the first to have demonstrated that maternal obesity
547 is associated with low local secretion of pro-inflammatory cytokines by term placental

548 explants. Indeed, we unexpectedly observed significantly lower placental production of
549 IL-6 in obese women, relative to non-obese women. Furthermore, we showed that
550 placental secretion levels of IL-10, MCP-1, and IL-1 β were lower (albeit not
551 significantly) in obese pregnant women. In parallel, we found that placental immune
552 cell counts (including macrophages, leukocytes, and endothelial cells) were
553 significantly lower in obese women than in non-obese women. Thus, the lower level of
554 placental cytokine production observed in samples from obese women might be due
555 (at least in part) to a reduction in immune cell numbers in the placenta itself. Since
556 placental cytokines have critical roles in the maintenance of pregnancy, this placental
557 adaptation might be a protective mechanism for sustaining trophoblast function and
558 counteracting the maternal inflammatory environment in the villous and intervillous
559 spaces.

560 Our study also showed that maternal obesity is associated with the activation of
561 placental ERK1/2, a target of the MAPK pathway, but not activation of the classical
562 inflammatory pathways (i.e. JNK and JAK2). This finding extends earlier work
563 describing greater placental activation of the p38 MAPK inflammatory pathway in
564 obese women [42]. Moreover, it is well known that inflammatory-related pathways
565 (including the MAPK pathway) are influenced by fatty acid levels. For example, the *in*
566 *vitro* exposure of human trophoblast cells to oleic acid activates ERK1/2 signaling [43].
567 Hence, we hypothesize that the placental ERK1/2 activation observed here in obese
568 women results from an excess of fatty acids, obviously a characteristic of the state of
569 obesity. Experiments designed to test this hypothesis are now underway in our
570 laboratory.

571 With regard to the influence of maternal obesity on nutrient transport, two recent *in*
572 *vitro* studies demonstrated the positive effect of physiological concentrations of

573 cytokines (IL-6 and TNF- α) on SNAT expression in primary human trophoblast cells of
574 non-obese women [41,44]. In the present study, we measured the side-specific mRNA
575 expression of *GLUTs*, *LATs*, and *SNATs* in third trimester placenta of obese and
576 control group. We found that in the control group only, placental mRNA expression
577 levels of *GLUT1*, *LAT1-2*, and *SNAT1-2* were significantly lower on the maternal side
578 than on the fetal side. This placental site-specific regulation of nutrient transporter
579 expression was not observed in the obese population, suggesting a potential
580 impairment of fetal-maternal nutrient exchanges. Furthermore, our results revealed
581 that maternal obesity was associated with low mRNA expression levels of *GLUT1*,
582 *LAT1-2*, and *SNAT1-2* on the fetal side of the placenta only. Our results are in
583 accordance with Farley et al., who found that human obesity was associated with low
584 SNAT activity and a low level of *SNAT4* mRNA in the placenta [45]. Farley et al.
585 suggested that the low level of placental amino acid transport was related to maternal
586 hyperleptinemia. Further, we have previously observed that the protein expression of
587 placental leptin receptor is significantly lower in obese women than in non-obese
588 women [46]. These data suggest that adaptive leptin resistance arises in the placenta
589 as a response to maternal hyperleptinemia.

590 The first layer of villi (closest to the maternal circulation) is made up of
591 syncytiotrophoblast (ST), which primarily control nutrient exchange. We therefore
592 studied the influence of maternal obesity on the mRNA expression of nutrient
593 transporters in isolated trophoblast cells. We found that the mRNA expression of *LAT1*
594 and *SNAT1* in ST was lower in obese women than in control women. However, under
595 our experimental conditions, we did not observe any intergroup differences in *GLUT1*,
596 *LAT2*, and *SNAT2* mRNA expression in isolated trophoblast cells. These apparent
597 discrepancies between placental mRNA expression and trophoblastic mRNA

598 expression might be explained (at least in part) by the presence of other cell types (e.g.
599 endothelial cells) expressing the same transporters [47]. Our results tended to confirm
600 this hypothesis, since we found fewer endothelial cells in placenta samples from obese
601 women. There are at least two possible mechanistic explanations for the
602 downregulation of nutrient transporter expression. Firstly, given that leptin and IL-6 are
603 known to stimulate SNAT activity in human trophoblasts *in vitro* [41], it is possible that
604 the low placental transporter expression in obese women results from lower levels of
605 placental cytokine secretion (as observed here). Secondly, epigenetic modifications
606 (such as DNA methylation, and post-translational histone modifications) and non-
607 coding RNAs might influence cytokine levels, as we have described previously for
608 human placental leptin and adiponectin systems [46].

609 In parallel, we assessed placental nutrient transporter activity (i.e. glucose, L-valine,
610 and L-alanine transport, as a marker of placental efficiency) in the obese and non-
611 obese groups. In fact, under our experimental conditions, we did not observe any
612 significant intergroup differences in amino acid transport. The reason for the absence
613 of lower placental nutrient efficiency in the obese women studied here remains to be
614 determined, although it might be related to an upregulation of placental amino acid
615 metabolism in the context of maternal obesity. Additional experiments are underway in
616 our laboratory.

617 Taken as a whole, our results indicate that maternal obesity alters the placental
618 transport of amino acids and glucose. Our findings support the hypothesis whereby the
619 placenta adapts its transport capacity in response to maternal nutritional cues and fetal
620 signals, in order to balance fetal demand with the mother's ability to sustain pregnancy
621 and fetal growth.

622 Placental nutrient transport depends on the placenta's size, shape (the surface area of
623 exchange zone, and the tissue thickness), nutrient transporter capacity/availability, and
624 utero- and feto-placental blood flows [48]. This is why we studied the placental
625 structure of obese and non-obese women using an innovative stereologic approach.
626 Our data did not reveal any intergroup differences in the surface area or volume of
627 placental components. However, we observed a lower fetal vessel density and greater
628 subchorial thrombosis in the obese group, suggesting that the placental vascular
629 pattern is altered by obesity. Furthermore, we observed a higher frequency of
630 subchorial fibrin deposits in the in the obese group. These deposits might interfere with
631 perfusion and gas/nutrient exchange in the intervillous space, which in turn might result
632 in the chronic placental insufficiency described by Andres et al. [49]. Lastly, we
633 demonstrated that endocrine function (as reflected by hCG and leptin production) is
634 markedly downregulated in a context of maternal obesity. Since hCG and leptin are
635 actively involved in the growth and development of the feto-placental unit [50,51], one
636 can hypothesize that low production of these hormones disturbs fetal growth and
637 increases the incidence of metabolic and cardiovascular diseases later in the infant's
638 life (i.e. as a result of developmental programming by the obese environment during
639 pregnancy).

640 In conclusion, and in contrast to our starting hypothesis, we found that maternal obesity
641 was associated with low placental nutritive transport, low numbers of immune cells,
642 and poor endocrine function at term (Figure 10). The birthweight was not affected,
643 however. Our data suggest that when exposed to a harmful environment (such as in
644 maternal obesity), the placenta has a certain degree of plasticity and can adapt in order
645 to optimize fetal growth and development. A better understanding of the cellular and

646 molecular mechanisms of placental adaptation is required because these changes
647 may determine (as least in part) the fetal outcome in cases of maternal obesity.

648

649 **Abbreviations**

650 BMI: body mass index; CRP: C-reactive protein; CS: calibration standard; DMEM:
651 Dulbecco's modified Eagle's medium; FBG: fasting blood glucose; FCS: fetal calf
652 serum; GD: gestational diabetes; GLUT: glucose transporter; hCG: human chorionic
653 gonadotropin; IL: interleukin; IS: internal standard; LAT: L-amino acid transporter; LC-
654 MS/MS: liquid chromatography-mass spectrometry; NF- κ B: nuclear factor κ B; SNAT:
655 system A sodium-dependent neutral amino acid transporter; TNF- α : tumor necrosis
656 alpha; ST: syncytiotrophoblast

657

658

659

660 **Figure legends**

661

662 **Figure 1: The inflammatory status of human third-trimester placental tissue.**

663 (A-F) The cytokine secretion profile (TNF- α , leptin, IL-10, MCP-1, IL-1 β , and IL-6) in
664 human third-trimester placenta. Supernatants of placental explants were collected after
665 a 48 h culture, and cytokine concentrations were assayed as described in the Methods
666 section. The data are quoted as the mean \pm SEM of n=10 placental explant cultures.

667 **: p<0.01 in a Mann-Whitney test. (b) The obese group vs. the non-obese (control)
668 group.

669

670 **Figure 2: Expression of total and phosphorylated JNK, ERK1/2, and JAK2**
671 **proteins in human third-trimester placental tissue.**

672 (A-B) Lysates of third-trimester placental biopsies from obese and non-obese women
673 were extracted and Western-blotted, as described in the Methods section. The data are
674 representative of two separate experiments, and are quoted as the mean \pm SEM.

675 *: p<0.05 in a Mann-Whitney test. (b) The obese group vs. the non-obese group.

676 (C-F) *p*-value and correlation coefficients were determined using Spearman's method,
677 as appropriate.

678

679 **Figure 3: Immune cell infiltration into human third-trimester placental tissue.**

680 Quantification of Hofbauer cells (CD14 staining) (A), leukocyte cells (CD45) (B), and
681 monocytes-macrophages (CD68) (C) in third-trimester placenta. Sections were fixed,
682 embedded in paraffin, and stained as described in the Methods section. The data are
683 quoted as the mean \pm SEM of n=16 placental sections.

684 **: p<0.01 in a Mann-Whitney test. (b) The obese group vs. the non-obese group.

685

686 **Figure 4: GLUT mRNA and protein expression levels in human third-trimester**
687 **placental tissue.**

688 (A-B) Placental mRNA expression of *GLUT 1* and *GLUT 3*. Total RNA was extracted
689 from the fetal and maternal sides of third-trimester placenta samples from non-obese
690 and obese women, and then analyzed using RT-qPCRs.

691 (C) Immunoblots and relative placental protein expression of GLUT1 in the obese and
692 non-obese groups. Lysates of third-trimester placental biopsies from non-obese and
693 obese women were extracted and Western-blotted, as described in the Methods
694 section. The data are representative of two separate experiments, and are quoted as
695 the mean \pm SEM.

696 (D-E) Placental mRNA expression of GLUT 1 and GLUT 3. After 72 h of culture, total
697 RNA was extracted from isolated trophoblast cells from non-obese and obese women,
698 and then analyzed using RT-qPCRs. The data are quoted as the mean \pm SEM.

699 *: $p < 0.05$ in a Wilcoxon test. (a) Maternal side vs. fetal side.

700 *: $p < 0.05$ in a Mann-Whitney test. (b) The obese group vs. the non-obese group.

701

702 **Figure 5: LAT mRNA expression levels in human third-trimester placental tissue.**

703 (A-B) Placental mRNA expression of *LAT1* and *LAT2*. Total RNA was extracted from
704 the fetal and maternal sides of third-trimester placental biopsies from non-obese and
705 obese women, and then analyzed using RT-qPCRs. The data are quoted as the mean
706 \pm SEM.

707 (C-D) Placental mRNA expression of *LAT1* and *LAT2*. After 72 h of culture, total RNA
708 was extracted from isolated trophoblast cells from non-obese and obese women, and
709 then analyzed using RT-qPCRs. The data are quoted as the mean \pm SEM.

710 *: $p < 0.05$ in a Wilcoxon test. (a) Maternal side vs. fetal side.

711 *: p<0.05; **: p<0.01 in a Mann-Whitney test. (b) The obese group vs. the non-obese
712 group.

713

714 **Figure 6: SNAT mRNA expression levels in human third-trimester placental**
715 **tissue.**

716 (A-B) Placental mRNA expression of *SNAT1* and *SNAT2*. Total RNA was extracted
717 from the fetal and maternal sides of third-trimester placental biopsies from non-obese
718 and obese women, and then analyzed using RT-qPCRs. The data are quoted as the
719 mean \pm SEM.

720 (C) Immunoblots and relative placental protein expression of SNAT1 in the obese and
721 non-obese groups. Lysates of third-trimester placental biopsies in non-obese and
722 obese women were extracted and then Western-blotted, as described in the Methods
723 section. The data are representative of two separate experiments, and are quoted as
724 the mean \pm SEM.

725 (D-E) Placental mRNA expression of *SNAT1* and *SNAT2*. After 72 h of culture, total
726 RNA was extracted from isolated trophoblast cells from non-obese and obese women,
727 and then analyzed using RT-qPCRs. The data are quoted as the mean \pm SEM.

728 *: p<0.05 in a Wilcoxon test. (a) Maternal side vs. fetal side.

729 *: p<0.05 in a Mann-Whitney test. (b) The obese group vs. the non-obese group.

730

731 **Figure 7: Placental perfusion of human third-trimester placenta**

732 Measurements of the transplacental transfer of the amino acids L-valine (A) and L-
733 alanine (B) during 90 min of perfusion, as described in the Method section. The obese
734 group vs. the non-obese group, Kruskal-Wallis.

735

736 **Figure 8: Structural components in human third-trimester placental tissue.**

737 Third-trimester placenta sections were fixed, embedded in paraffin, and stained with
738 hematoxylin-eosin reagent for the stereologic analysis of the volume (A) and surface
739 area (B) of structural components in the placenta, as described in the Methods section.

740 The data are quoted as the mean \pm SEM of n=16 placental sections. The obese group
741 was compared with the non-obese group.

742 Quantification of the capillary endothelial cell density in the placenta, using CD31
743 staining (C) and CD34 staining (D). The data are quoted as the mean \pm SEM of n=16
744 placental sections.

745 *: p<0.05 in a Mann-Whitney test. (b) The obese group vs. the non-obese group.

746

747 **Figure 9: hCG secretion and leptin mRNA expression in ST isolated from third-**
748 **trimester placental tissue.**

749 (A) hCG secretion in supernatant of isolated trophoblast cells collected after 72 h of
750 culture. The data are quoted as the mean \pm SEM.

751 (B) Leptin mRNA expression. Total RNA was extracted from isolated trophoblast cells
752 from non-obese and obese women after 72 h of culture, and then analyzed using RT-
753 qPCRs. The data are quoted as the mean \pm SEM.

754 *: p<0.05 in a Mann-Whitney test. (b) The obese group vs. the non-obese group.

755

756 **Figure 10: Impact of maternal obesity on major placental functions**

757 Obese women present systemic inflammation (higher CRP levels), which might alter
758 placental functions. Indeed, local cytokine production and immune cell infiltration were
759 lower in the placenta, and may contribute to a lower local inflammatory status. The
760 inflammatory balance is important for the placenta's structural development; obesity is

761 associated with a lower density of fetal placental vessels, which might impair fetal
762 exchanges (e.g. nutrient transport capacity and the expression of nutrient transporters).
763 Furthermore, the endocrine functions characterized by two major markers (hCG and
764 leptin) are impaired in obesity, and might affect all the placental functions. Hence, the
765 placenta appears to adapt to the harmful maternal environment, so that fetal growth is
766 protected. Even though the birthweights were similar in the obese and non-obese
767 groups, changes in the placenta alterations might still lead to fetal programming and
768 then metabolic disease in adulthood.

769

770 **Declarations**

771 *Ethics approval and consent to participate*

772 The present study was approved by the local investigational review board (*Comité*
773 *Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Médicale*; reference
774 protocol 01-78). All participants provided their written informed consent prior to tissue
775 sampling.

776

777 *Consent for publication*

778 Not applicable.

779

780 *Availability of data and material*

781 All data generated or analyzed during the study are included in this article.

782

783 *Competing interests*

784 The authors declare that they have no competing interests.

785 *Funding*

786 This work was funded by the Institut de Recherche en Santé de la Femme, based at
787 the UFR des Sciences de la Santé, University of Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines
788 (Montigny-le-Bretonneux, France), and the Maternité et Médecine de la Reproduction
789 Association, based at the CHI de Poissy-Saint-Germain-en-Laye (Poissy, France).

790

791 *Author's contributions*

792 P.N. and M.N.D. designed the experiments. P.N. and L.A. performed the experiments.
793 A.T. contributed to the stereology experiments. S.G-D performed LC-MS/MS
794 experiments. P.B. provided human placental tissue for experiments. P.N. and M.N.D.
795 analyzed the data. P.N. and M.N.D. wrote the manuscript. F.V. obtained research
796 funding. All authors read and approved the final manuscript.

797

798 *Acknowledgments*

799 The authors thank the staff at the Department of Gynaecology and Obstetrics at CHI
800 Poissy-Saint-Germain-en-Laye for kindly providing human placental tissue. LC-
801 MC/MC experiments were performed at the MasSpecLab facility, funded by the
802 University of Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines, the Ile-de-France region, the
803 Yvelines Country Council and the Saint-Quentin-en-Yvelines Urban Community. We
804 thank Marta Hita-Hernandez for technical support.

805

806 **Tables**

807

808 **Table 1:** Primary antibodies used for immunoblotting

Targets	Species	Blocking	Dilution	Incubation	Supplier	Reference
GLUT1	Rabbit	Gelatin 2.5% (2 h)	1:2500	Room temperature	Abcam	ab14683
SNAT1	Goat	Gelatin 2.5% (2 h)	1:200	Room temperature	Santa Cruz Biotechnology	sc-33441
Phospho-SAPK/JNK	Rabbit	Milk 5% (1 h)	1:1000	+4°C	Cell Signaling	#4668, Thr183/Thr185
SAPK/JNK	Rabbit	Milk 5% (1 h)	1:1000	+4°C	Cell Signaling	#9252
Phospho-p44/42-MAPK	Rabbit	Milk 5% (1 h)	1:1000	+4°C	Cell Signaling	Erk1/2, Thr202/Thr204, #4370
p44/42-MAPK	Rabbit	Milk 5% (1 h)	1:1000	+4°C	Cell Signaling	Erk1/2, #4695
Phospho-JAK2	Rabbit	Milk 5% (1 h)	1:500	+4°C	Cell Signaling	#4406, Tyr 1007
JAK2	Rabbit	Milk 5% (1 h)	1:500	+4°C	Cell Signaling	#3230
β-actin	Rabbit	Milk 5% (1 h)	1:1000	+4°C	Sigma Aldrich	A2066

809

810

811

812

813

814

815

816

817

818

819

820

821

822

823

824

825

826

827

828

829

830

831

832

833

834

835

836
837
838

Table 2: Primers used for RT-PCRs

Primer set	Sequence (5'-3')	PCR product (bp)
GLUT1	F: TGA GCA TCG TGG CCA TCT TT R: CCG GAA GCG ATC TCA TCG AA	298
GLUT3	F: CAG GCA CAC GGT GCA GAT AG R: GCA GGC TCG ATG CTG TTC AT	67
LAT1	F: ACC ACC ATC TCC AAA TCG GG R: GAG CAG CAG CAC GCA GA	225
LAT2	F: GAG GCA GCT TTT GAG GTT GC R: GCC GAT GAT GTT CCC TAC GA	202
SNAT1	F: GTG TAT GCT TTA CCC ACC ATT GC R: GCA CGT TGT CAT AGA ATG TCA AGT	187
SNAT2	F: ACG AAA CAA TAA ACA CCA CCT TAA R: AGA TCA GAA TTG GCA CAG CAT A	141
SNAT4	F: TTG CCG CCC TCT TTG GTT AC R: GAG GAC AAT GGG CAC AGT TAG T	152
LEP	F: TCC ACA CAC GCA GTC AGT CTC R: CTG CCA GTG TCT GGT CCA TC	107
B2M	F: TGC TGT CTC CAT GTT TGA TGT ATC T R: TCT CTG CTC CCC ACC TCT AAG T	86
RP13	F: CCT GGA GGA GAA GAG GAA AGA GA R: TTG AGG ACC TCT GTG TAT TGT CAA	125
TBP	F: TGC ACA GGA GCC AAG AGT GAA R: CAC ACT ACA GCT CCC CAC CA	132

839
840

841 **Table 3:** Maternal and neonatal clinical characteristics

Variable	Control (n=36)	Obese (n=29)	p-value	Significance
Ethnicity	All Caucasian	All Caucasian		
Maternal age (y)	34 ± 4	33 ± 5	0.243	ns
Maternal height (m)	1.64 ± 0.07	1.65 ± 0.07	0.316	ns
Maternal weight (pre-pregnancy) (kg)	58.2 ± 8.45	100.9 ± 15.59	< 0.0001	***
BMI (pre-pregnancy) (m²/kg)	22 ± 2.76	37 ± 4.49	< 0.0001	***
Gestational age delivery (Weeks of amenorrhea)	38.8 ± 0.96	38.31 ± 0.85	0.014	*
Placental weight (g)	659.2 ± 135.1	713.2 ± 155.8	0.076	ns
Placental length	19.27 ± 2.3	18.59 ± 2.1	0.153	ns
Placental width	16.9 ± 1.6	17.17 ± 2.7	0.319	ns
Infant's sex (% male)	51	45	0.285	ns
Birthweight (g)	3431 ± 612.6	3353 ± 363.9	0.440	ns
Birthweight/placental weight ratio	5.29 ± 0.76	4.86 ± 0.77	0.021	*
Birthweight of male infants (g)	3525.83 ± 686.3	3323 ± 252.9	0.235	ns
Birthweight of female infants (g)	3335 ± 531.4	3406 ± 445.5	0.365	ns
Placental weight for male infants (g)	681.6 ± 121.2	679.9 ± 90.15	0.420	ns
Placental weight for female infants (g)	636.83 ± 147.6	740.9 ± 192.38	0.071	ns
Birthweight/placental weight ratio for male infants	5.20 ± 0.68	4.93 ± 0.51	0.144	ns
Birthweight/placental weight ratio for female infants	5.37 ± 0.68	4.80 ± 0.23	0.030	*

842

843

844 **Table 4:** Maternal blood levels of lipids and inflammatory markers

Variable	Control (n= 14)	Obese (n= 14)	p-value	Significance
Haptoglobin (g/L)	0.93 ± 0.25	0.94 ± 0.34	0.981	ns
Orosomuroid (g/L)	0.54 ± 0.08	0.58 ± 0.09	0.334	ns
CRP (mmol/L)	3.32 ± 2.29	5.97 ± 3.82	0.022	*
Total cholesterol (mmol/L)	7.52 ± 1.30	6.54 ± 1.44	0.076	ns
Triglycerides (mmol/L)	2.80 ± 1.06	2.60 ± 0.72	0.730	ns
HDL (mmol/L)	1.76 ± 0.40	1.38 ± 0.27	0.012	*
LDL (mmol/L)	4.49 ± 1.12	3.97 ± 1.47	0.250	ns
Glucose (mmol/L)	3.83 ± 0.38	4.37 ± 1.26	0.182	ns

845

846

847 **References**

- 848 [1] GBD 2015 Obesity Collaborators. Health Effects of Overweight and Obesity in 195
849 Countries over 25 Years. *N Engl J Med* 2017;377:13–27. doi:10.1056/NEJMoa1614362.
- 850 [2] World Health Organization. Obesity and overweight n.d. [https://www.who.int/news-](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight)
851 [room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight) (accessed July 10, 2019).
- 852 [3] Ogden CL, Carroll MD, Kit BK, Flegal KM. Prevalence of Childhood and Adult
853 Obesity in the United States, 2011–2012. *JAMA* 2014;311:806–14.
854 doi:10.1001/jama.2014.732.
- 855 [4] Jevé YB, Konje JC, Doshani A. Placental dysfunction in obese women and antenatal
856 surveillance strategies. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2015;29:350–64.
857 doi:10.1016/j.bpobgyn.2014.09.007.
- 858 [5] Boney CM, Verma A, Tucker R, Vohr BR. Metabolic syndrome in childhood:
859 association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus. *Pediatrics*
860 2005;115:e290-296. doi:10.1542/peds.2004-1808.
- 861 [6] Leon DA, Lithell HO, Vågerö D, Koupilová I, Mohsen R, Berglund L, et al. Reduced
862 fetal growth rate and increased risk of death from ischaemic heart disease: cohort study of 15
863 000 Swedish men and women born 1915-29. *BMJ* 1998;317:241–5.
- 864 [7] Harder T, Plagemann A, Harder A. Birth weight and subsequent risk of childhood
865 primary brain tumors: a meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2008;168:366–73.
866 doi:10.1093/aje/kwn144.
- 867 [8] Díaz P, Powell TL, Jansson T. The Role of Placental Nutrient Sensing in Maternal-
868 Fetal Resource Allocation. *Biol Reprod* 2014;91. doi:10.1095/biolreprod.114.121798.
- 869 [9] Brett KE, Ferraro ZM, Yockell-Lelievre J, Gruslin A, Adamo KB. Maternal–Fetal
870 Nutrient Transport in Pregnancy Pathologies: The Role of the Placenta. *Int J Mol Sci*
871 2014;15:16153–85. doi:10.3390/ijms150916153.
- 872 [10] Augustin R, Carayannopoulos MO, Dowd LO, Phay JE, Moley JF, Moley KH.
873 Identification and Characterization of Human Glucose Transporter-like Protein-9 (GLUT9)
874 ALTERNATIVE SPLICING ALTERS TRAFFICKING. *J Biol Chem* 2004;279:16229–36.
875 doi:10.1074/jbc.M312226200.
- 876 [11] Jansson T, Wennergren M, Illsley NP. Glucose transporter protein expression in
877 human placenta throughout gestation and in intrauterine growth retardation. *J Clin Endocrinol*
878 *Metab* 1993;77:1554–62. doi:10.1210/jcem.77.6.8263141.

- 879 [12] Prasad PD, Wang H, Huang W, Kekuda R, Rajan DP, Leibach FH, et al. Human
880 LAT1, a Subunit of System L Amino Acid Transporter: Molecular Cloning and Transport
881 Function. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;255:283–8. doi:10.1006/bbrc.1999.0206.
- 882 [13] Pineda M, Fernández E, Torrents D, Estévez R, López C, Camps M, et al.
883 Identification of a Membrane Protein, LAT-2, That Co-expresses with 4F2 Heavy Chain, an
884 L-type Amino Acid Transport Activity with Broad Specificity for Small and Large
885 Zwitterionic Amino Acids. *J Biol Chem* 1999;274:19738–44. doi:10.1074/jbc.274.28.19738.
- 886 [14] Desforges M, Mynett KJ, Jones RL, Greenwood SL, Westwood M, Sibley CP, et al.
887 The SNAT4 isoform of the system A amino acid transporter is functional in human placental
888 microvillous plasma membrane. *J Physiol* 2009;587:61–72.
889 doi:10.1113/jphysiol.2008.161331.
- 890 [15] Hatanaka T, Huang W, Wang H, Sugawara M, Prasad PD, Leibach FH, et al. Primary
891 structure, functional characteristics and tissue expression pattern of human ATA2, a subtype
892 of amino acid transport system A. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr* 2000;1467:1–6.
893 doi:10.1016/S0005-2736(00)00252-2.
- 894 [16] Wang H, Huang W, Sugawara M, Devoe LD, Leibach FH, Prasad PD, et al. Cloning
895 and Functional Expression of ATA1, a Subtype of Amino Acid Transporter A, from Human
896 Placenta. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;273:1175–9. doi:10.1006/bbrc.2000.3061.
- 897 [17] Acosta O, Ramirez VI, Lager S, Gaccioli F, Dudley DJ, Powell TL, et al. Increased
898 glucose and placental GLUT-1 in large infants of obese nondiabetic mothers. *Am J Obstet*
899 *Gynecol* 2015;212:227.e1-227.e7. doi:10.1016/j.ajog.2014.08.009.
- 900 [18] Gaccioli F, Aye ILMH, Roos S, Lager S, Ramirez VI, Kanai Y, et al. Expression and
901 functional characterisation of System L amino acid transporters in the human term placenta.
902 *Reprod Biol Endocrinol RBE* 2015;13. doi:10.1186/s12958-015-0054-8.
- 903 [19] Farley DM, Choi J, Dudley DJ, Li C, Jenkins SL, Myatt L, et al. Placental Amino
904 Acid Transport and Placental Leptin Resistance in Pregnancies Complicated by Maternal
905 Obesity. *Placenta* 2010;31:718–24. doi:10.1016/j.placenta.2010.06.006.
- 906 [20] Ditchfield AM, Desforges M, Mills TA, Glazier JD, Wareing M, Mynett K, et al.
907 Maternal obesity is associated with a reduction in placental taurine transporter activity. *Int J*
908 *Obes* 2015;39:557–64. doi:10.1038/ijo.2014.212.
- 909 [21] Schmitz ML, Weber A, Roxlau T, Gaestel M, Kracht M. Signal integration, crosstalk
910 mechanisms and networks in the function of inflammatory cytokines. *Biochim Biophys Acta*
911 *BBA - Mol Cell Res* 2011;1813:2165–75. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.06.019.

- 912 [22] El-Wakkad A, Hassan NE-M, Sibaii H, El-Zayat SR. Proinflammatory, anti-
913 inflammatory cytokines and adiponkines in students with central obesity. *Cytokine*
914 2013;61:682–7. doi:10.1016/j.cyto.2012.11.010.
- 915 [23] Roberts KA, Riley SC, Reynolds RM, Barr S, Evans M, Statham A, et al. Placental
916 structure and inflammation in pregnancies associated with obesity. *Placenta* 2011;32:247–54.
917 doi:10.1016/j.placenta.2010.12.023.
- 918 [24] Saben J, Lindsey F, Zhong Y, Thakali K, Badger TM, Andres A, et al. Maternal
919 Obesity is Associated with a Lipotoxic Placental Environment. *Placenta* 2014;35:171–7.
920 doi:10.1016/j.placenta.2014.01.003.
- 921 [25] Loardi C, Falchetti M, Prefumo F, Facchetti F, Frusca T. Placental morphology in
922 pregnancies associated with pregravid obesity. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2016;29:2611–6.
923 doi:10.3109/14767058.2015.1094792.
- 924 [26] Challier J, Basu S, Bintein T, Hotmire K, Minium J, Catalano P, et al. Obesity in
925 pregnancy stimulates macrophage accumulation and inflammation in the placenta. *Placenta*
926 2008;29:274–81. doi:10.1016/j.placenta.2007.12.010.
- 927 [27] Allbrand M, Bjorkqvist M, Nilsson K, Ostlund I, Aman J. Placental gene expression of
928 inflammatory markers and growth factors – a case control study of obese and normal weight
929 women. *J Perinat Med* 2014;43:159–164. doi:10.1515/jpm-2013-0343.
- 930 [28] Hauguel-de Mouzon S, Guerre-Millo M. The Placenta Cytokine Network and
931 Inflammatory Signals. *Placenta* 2006;27:794–8. doi:10.1016/j.placenta.2005.08.009.
- 932 [29] Rusterholz C, Hahn S, Holzgreve W. Role of placentally produced inflammatory and
933 regulatory cytokines in pregnancy and the etiology of preeclampsia. *Semin Immunopathol*
934 2007;29:151–62. doi:10.1007/s00281-007-0071-6.
- 935 [30] Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français. *J Gynécologie*
936 *Obstétrique Biol Reprod* 2005;34:513. doi:10.1016/S0368-2315(05)82867-4.
- 937 [31] International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Recommendations
938 on the Diagnosis and Classification of Hyperglycemia in Pregnancy. *Diabetes Care*
939 2010;33:676–82. doi:10.2337/dc09-1848.
- 940 [32] Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM, Strauss JF. Purification,
941 Characterization, and in vitro Differentiation of Cytotrophoblasts from Human Term
942 Placentae. *Endocrinology* 1986;118:1567–82. doi:10.1210/endo-118-4-1567.
- 943 [33] Schneider H, Panigel M, Dancis J. Transfer across the perfused human placenta of
944 antipyrine, sodium and leucine. *Am J Obstet Gynecol* 1972;114:822–8.

945 [34] Gavard L, Beghin D, Forestier F, Cayre Y, Peytavin G, Mandelbrot L, et al.
946 Contribution and limit of the model of perfused cotyledon to the study of placental transfer of
947 drugs. Example of a protease inhibitor of HIV: nelfinavir. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*
948 2009;147:157–60. doi:10.1016/j.ejogrb.2009.08.007.

949 [35] Pastrakuljic A, Derewlany LO, Knie B, Koren G. The Effects of Cocaine and Nicotine
950 on Amino Acid Transport across the Human Placental Cotyledon Perfused In Vitro. *J*
951 *Pharmacol Exp Ther* 2000;294:141–6.

952 [36] CRUZ-ORIVE LM. Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in
953 Microscopy. *J Anat* 1999;194:153–7. doi:10.1046/j.1469-7580.1999.194101536.x.

954 [37] Reed MG, Howard CV, DE Yanés GS. One-stop stereology: the estimation of 3D
955 parameters using isotropic rulers. *J Microsc* 2010;239:54–65. doi:10.1111/j.1365-
956 2818.2009.03356.x.

957 [38] Saben J, Lindsey F, Zhong Y, Thakali K, Badger TM, Andres A, et al. Maternal
958 Obesity is Associated with a Lipotoxic Placental Environment. *Placenta* 2014;35:171–7.
959 doi:10.1016/j.placenta.2014.01.003.

960 [39] Mitanchez D, Jacqueminet S, Nizard J, Tanguy M-L, Ciangura C, Lacorte J-M, et al.
961 Effect of maternal obesity on birthweight and neonatal fat mass: A prospective clinical trial.
962 *PLoS ONE* 2017;12. doi:10.1371/journal.pone.0181307.

963 [40] Calabuig-Navarro V, Haghiac M, Minium J, Glazebrook P, Ranasinghe GC, Hoppel
964 C, et al. Effect of maternal obesity on placental lipid metabolism. *Endocrinology* 2017.
965 doi:10.1210/en.2017-00152.

966 [41] Jones HN, Jansson T, Powell TL. IL-6 stimulates system A amino acid transporter
967 activity in trophoblast cells through STAT3 and increased expression of SNAT2. *Am J*
968 *Physiol - Cell Physiol* 2009;297:C1228–35. doi:10.1152/ajpcell.00195.2009.

969 [42] Aye ILMH, Lager S, Ramirez VI, Gaccioli F, Dudley DJ, Jansson T, et al. Increasing
970 Maternal Body Mass Index Is Associated with Systemic Inflammation in the Mother and the
971 Activation of Distinct Placental Inflammatory Pathways. *Biol Reprod* 2014;90.
972 doi:10.1095/biolreprod.113.116186.

973 [43] Lager S, Jansson T, Powell TL. Differential regulation of placental amino acid
974 transport by saturated and unsaturated fatty acids. *Am J Physiol - Cell Physiol*
975 2014;307:C738–44. doi:10.1152/ajpcell.00196.2014.

976 [44] Aye ILMH, Jansson T, Powell TL. TNF- α stimulates System A amino acid transport
977 in primary human trophoblast cells mediated by p38 MAPK signaling. *Physiol Rep* 2015;3.
978 doi:10.14814/phy2.12594.

979 [45] Farley DM, Choi J, Dudley DJ, Li C, Jenkins SL, Myatt L, et al. Placental Amino
980 Acid Transport and Placental Leptin Resistance in Pregnancies Complicated by Maternal
981 Obesity. *Placenta* 2010;31:718–24. doi:10.1016/j.placenta.2010.06.006.

982 [46] Nogues P, Dos Santos E, Jammes H, Berveiller P, Arnould L, Vialard F, et al.
983 Maternal obesity influences expression and DNA methylation of the adiponectin and leptin
984 systems in human third-trimester placenta. *Clin Epigenetics* 2019;11. doi:10.1186/s13148-
985 019-0612-6.

986 [47] Illsley NP. CURRENT TOPIC: Glucose Transporters in the Human Placenta. *Placenta*
987 2000;21:14–22. doi:10.1053/plac.1999.0448.

988 [48] Brett KE, Ferraro ZM, Yockell-Lelievre J, Gruslin A, Adamo KB. Maternal–Fetal
989 Nutrient Transport in Pregnancy Pathologies: The Role of the Placenta. *Int J Mol Sci*
990 2014;15:16153–85. doi:10.3390/ijms150916153.

991 [49] Andres RL, Kuyper W, Resnik R, Piacquadro KM, Benirschke K. The association of
992 maternal floor infarction of the placenta with adverse perinatal outcome. *Am J Obstet*
993 *Gynecol* 1990;163:935–8. doi:10.1016/0002-9378(90)91100-q.

994 [50] Vaughan OR, Rosario FJ, Powell TL, Jansson T. Regulation of Placental Amino Acid
995 Transport and Fetal Growth. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2017;145:217–51.
996 doi:10.1016/bs.pmbts.2016.12.008.

997 [51] Nwabuobi C, Arlier S, Schatz F, Guzeloglu-Kayisli O, Lockwood CJ, Kayisli UA.
998 hCG: Biological Functions and Clinical Applications. *Int J Mol Sci* 2017;18.
999 doi:10.3390/ijms18102037.

1000

1001

Figure 1

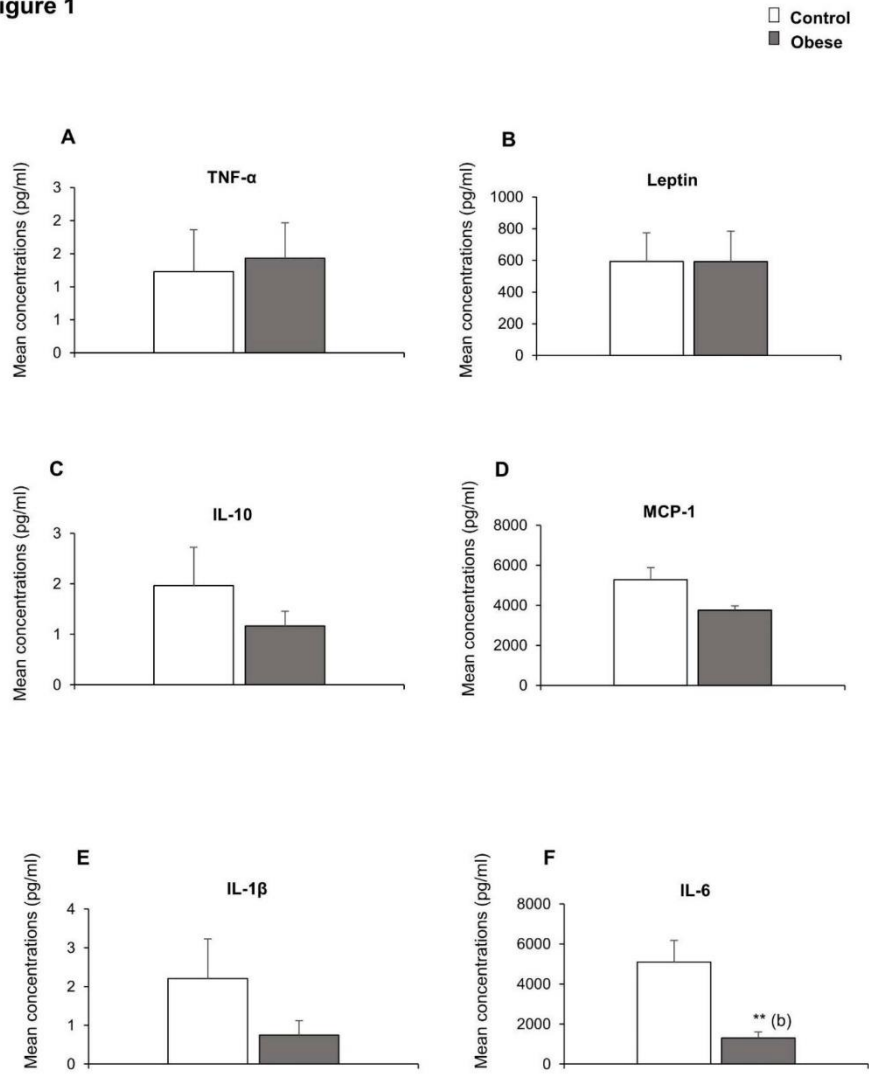
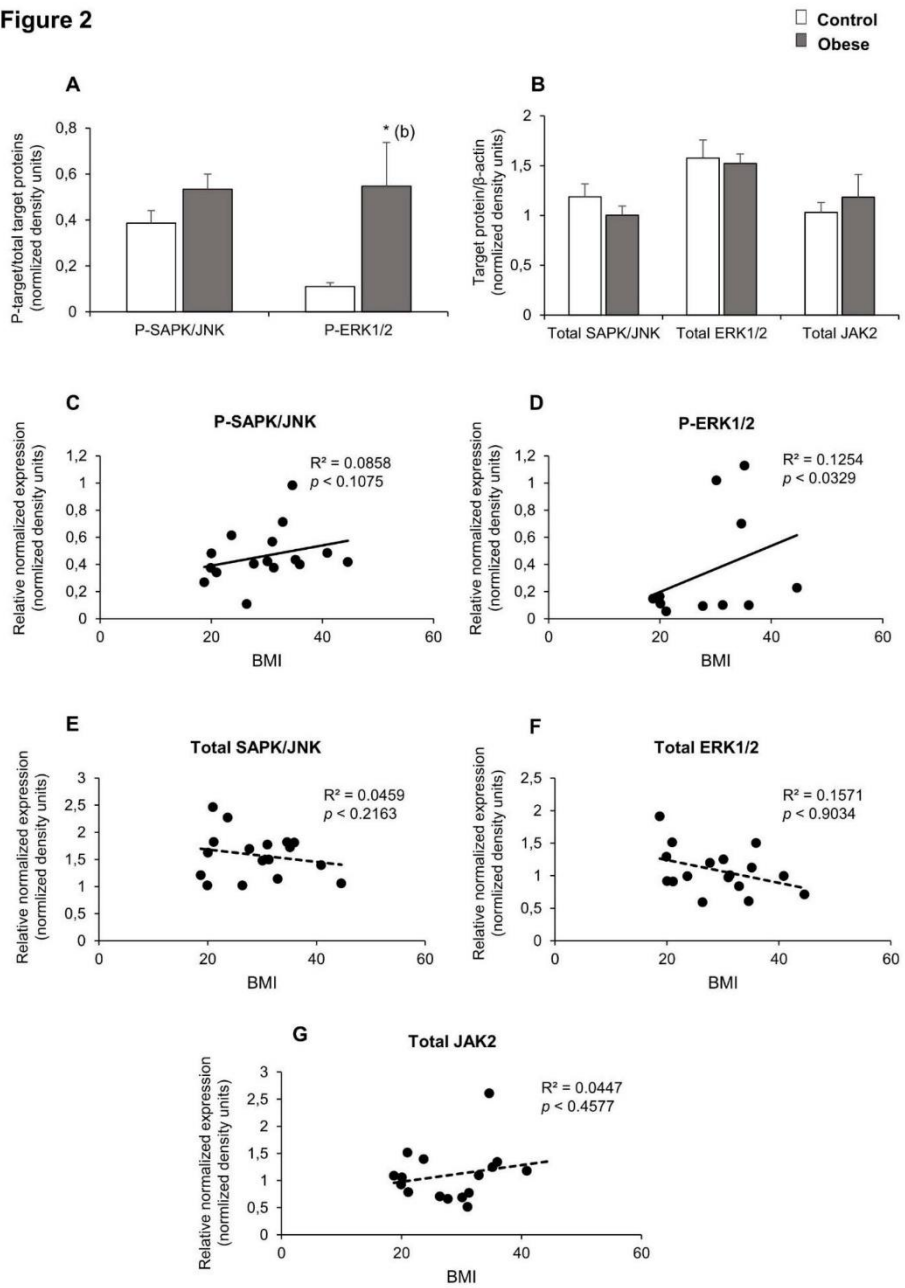


Figure 2



1003

Figure 3

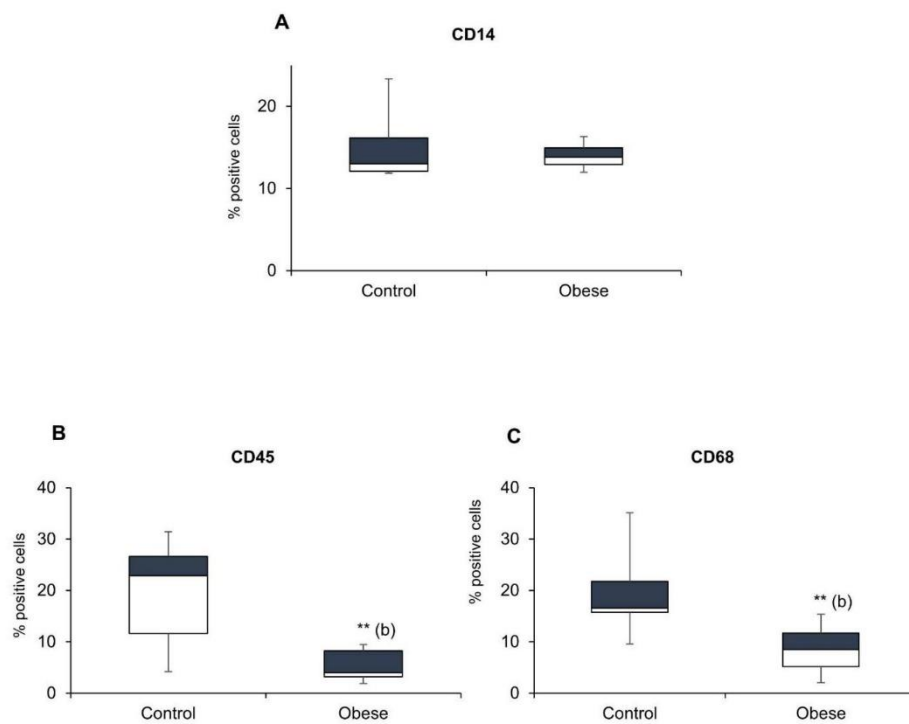
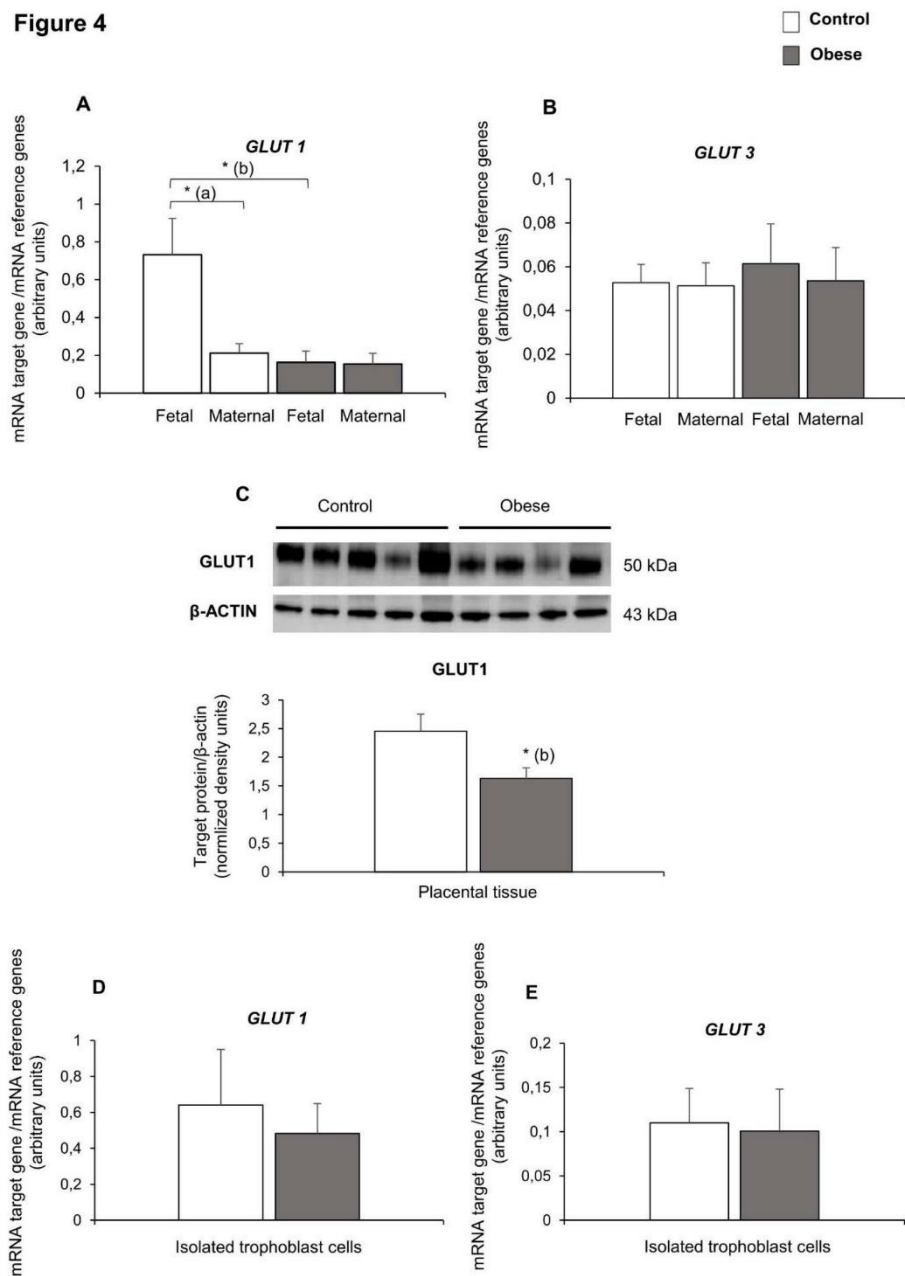


Figure 4



1005

Figure 5

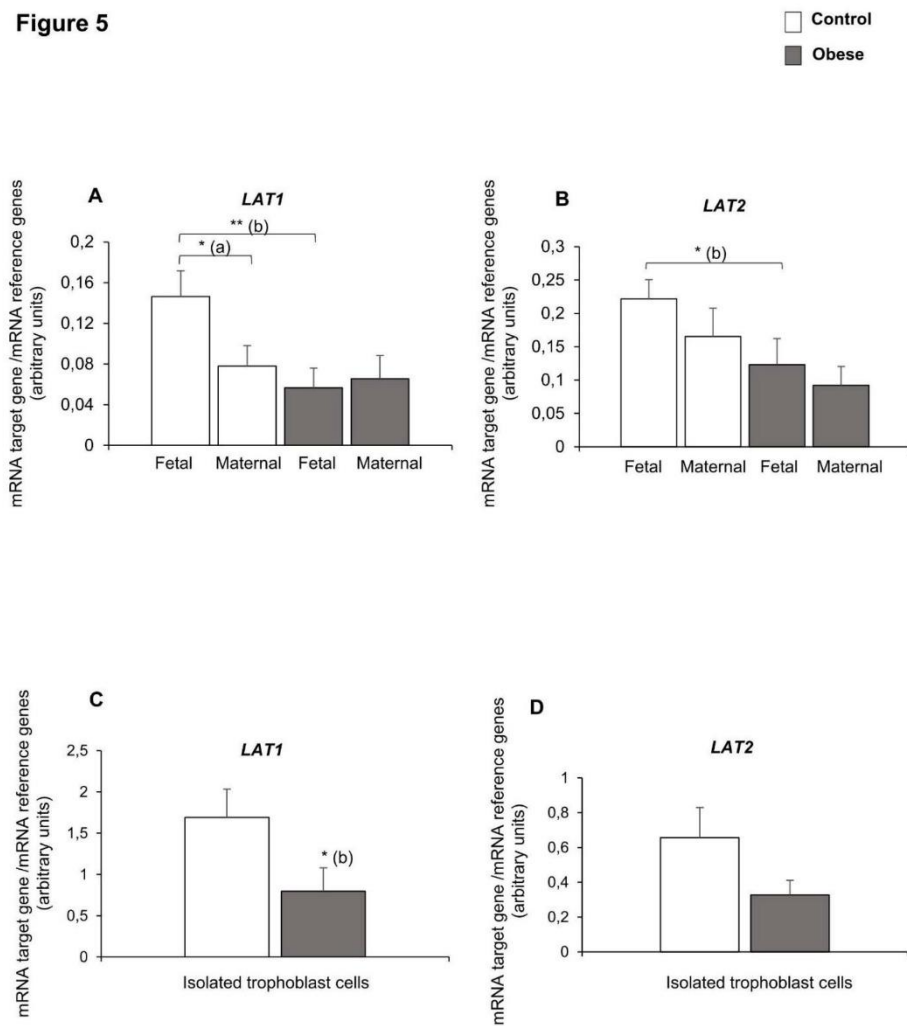
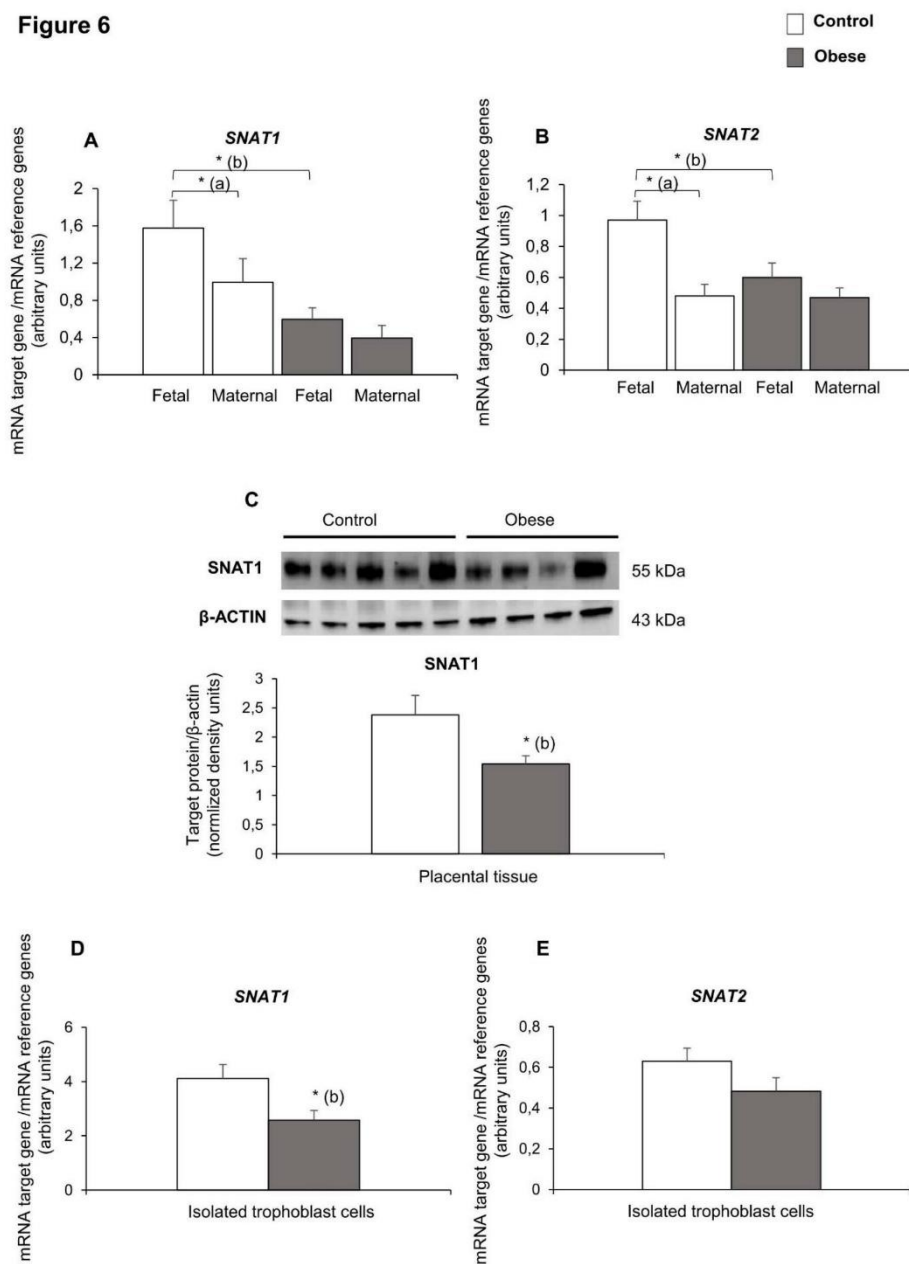


Figure 6



1007

Figure 7

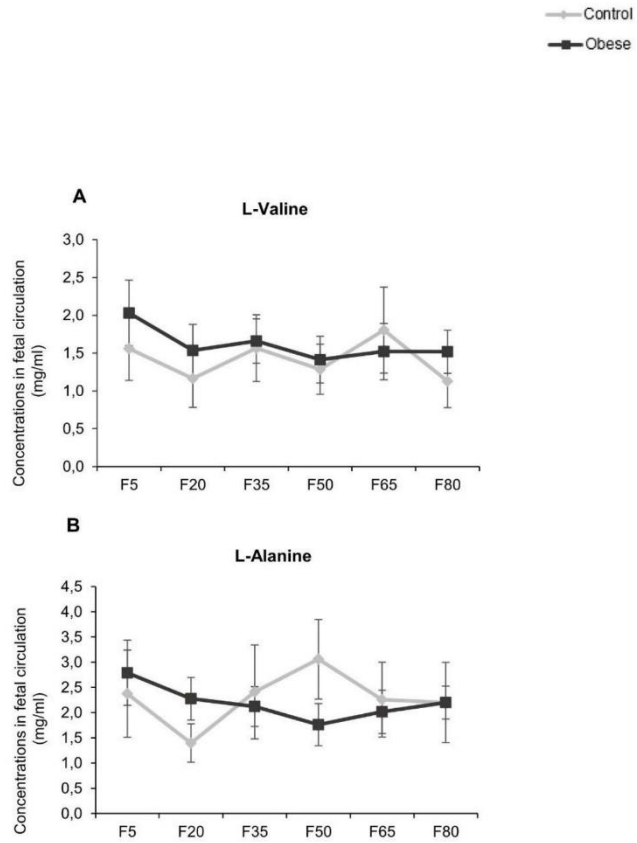
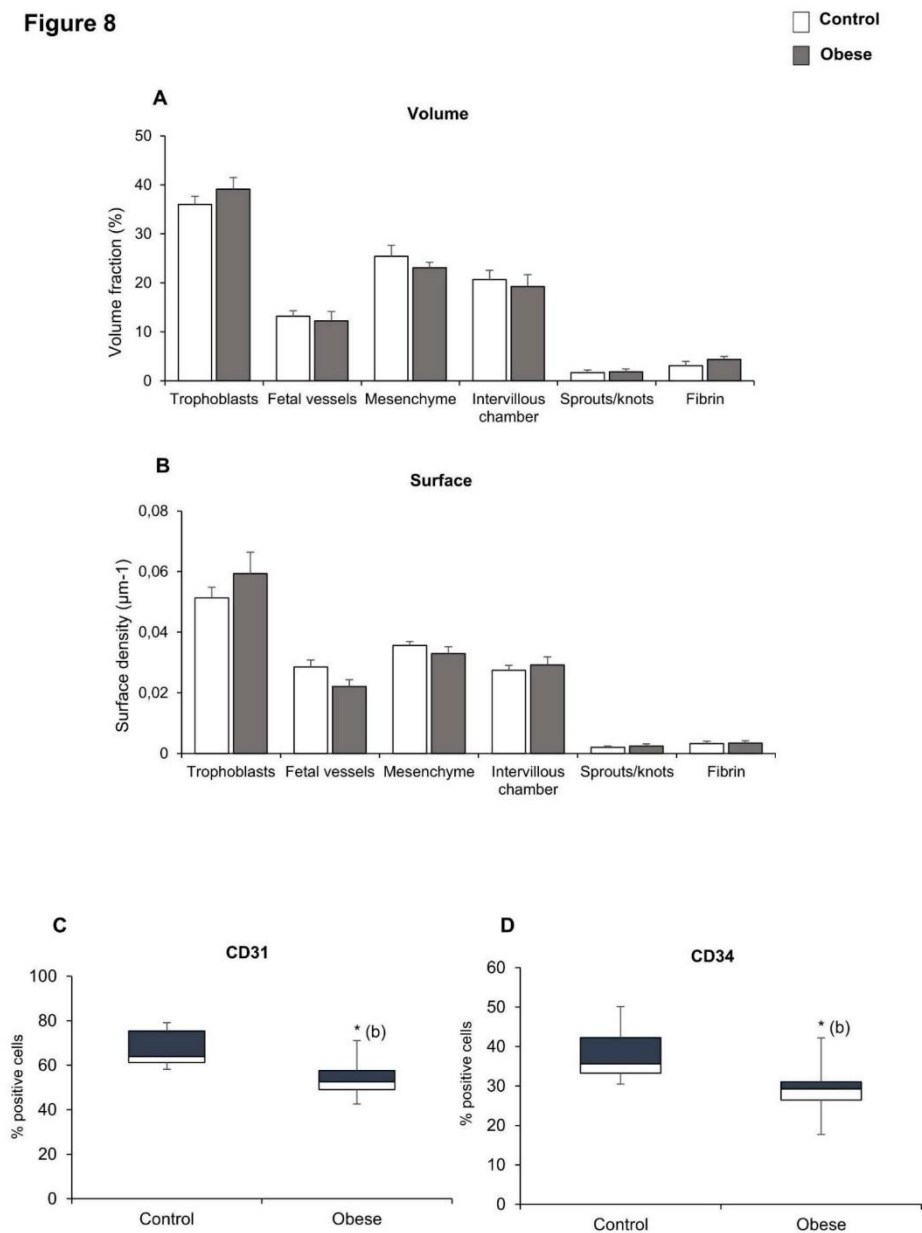


Figure 8



1009

Figure 9

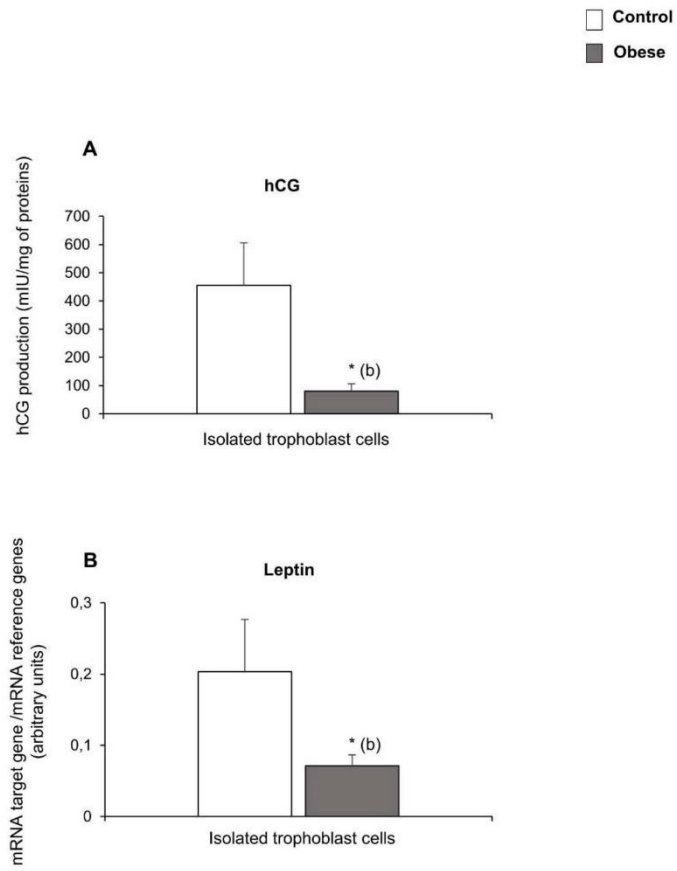
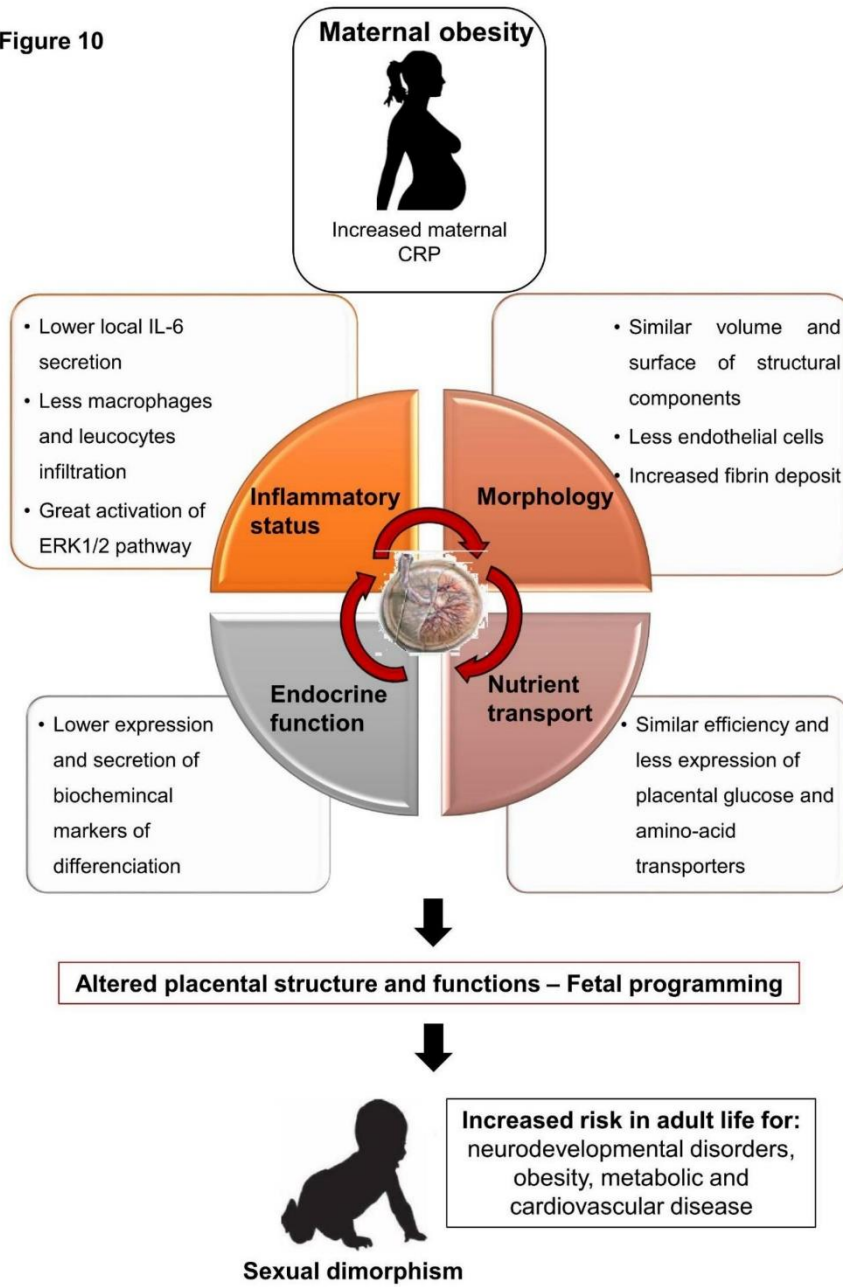


Figure 10



1011

1012

Supplemental data

1013

1014 **Table S1:** Gradient used for the analysis (mobile phase was A, B, C respectively water in containing

1015 200 mM ammonium formate and adjusted to pH=3.0.

Time (min)	%A	%B	%C
0	10	0	90
1	10	0	90
9	10	40	50
12	10	40	50
12.1	10	0	90
16	10	0	90

1016

1017

1018 **Table S2a:** Concentration of working solutions (ng/ml).

Parameter	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
Alanine	2500	5000	10000	25000	50000	75000	100000	150000
Valine	2500	5000	10000	20000	30000	50000	75000	100000
Arginine	2500	5000	10000	20000	30000	50000	75000	100000
Antipyrine	500	1000	2000	3000	4000	5000	7500	10000

1019

1020

1021 **Table S2b:** Concentration of calibration standards (ng/ml).

Parameter	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8
Alanine	250	500	1000	2500	5000	7500	10000	15000
Valine	250	500	1000	2000	3000	5000	7500	10000
Arginine	250	500	1000	2000	3000	5000	7500	10000
Antipyrine	50	100	200	300	400	500	750	1000

1022

1023

1024

1025

1026 **Table S2c:** Concentration of quality controls (ng/ml).

Parameter	CQ1	CQ2	CQ3
Alanine	1600	8000	16000
Valine	1600	4800	12000
Arginine	1600	4800	12000
Antipyrine	320	640	1200

1027

1028

Article 2

Caractérisation des systèmes leptine et adiponectine dans les placentas de femmes obèses

Maternal obesity influences expression and DNA methylation of the adiponectin and leptin systems in human third-trimester placenta

Perrine Nogues, Esther Dos Santos, Hélène Jammes, Paul Berveiller, Lucie Arnould,
François Vialard and Marie-Noëlle Dieudonné

CLINICAL EPIGENETICS (2019)

Introduction

Il est maintenant bien établi que le placenta n'est pas un tissu passif médiateur des échanges fœtaux-maternels. En effet, le placenta peut modifier sa capacité à subvenir aux besoins fœtaux en réponse à des facteurs intrinsèques (par exemple, l'âge gestationnel) et à des facteurs extrinsèques (par exemple, des variations nutritionnelles et d'autres facteurs environnementaux). L'obésité maternelle constitue un environnement délétère pro-inflammatoire généré par un excès de tissu adipeux et semble altérer les fonctions placentaires. Des études récentes ont clairement démontré qu'un environnement maternel délétère entraîne l'apparition de marques épigénétiques (méthylation de l'ADN, modifications des histones, micro-ARN, etc.) dans le placenta humain. Ces modifications épigénétiques peuvent être associées à une reprogrammation fœtale pendant la grossesse. Plus précisément, certaines régions du génome sont méthylées et hydroxyméthylées de manière différentielle. Les taux de méthylation de l'ADN placentaire semblent être 21% plus élevés dans un groupe obèse (par rapport à un groupe contrôle), tandis que les taux d'hydroxyméthylation seraient inférieurs de 31%.

La leptine et l'adiponectine sont deux hormones majoritairement produites par le tissu adipeux. Elles régulent l'homéostasie énergétique, l'inflammation et l'angiogenèse en exerçant des effets centraux ou périphériques via leurs récepteurs spécifiques LEPR pour la leptine et ADIPOR1/R2 pour l'adiponectine. La leptine est également produite par le placenta et les récepteurs LEPR et ADIPOR sont exprimés dans le placenta de 1^{er} et 3^{ème} trimestre.

De nombreuses études ont clairement décrit l'implication de la leptine et de l'adiponectine dans la grossesse humaine. En effet, ces deux adipokines favorisent le développement d'un placenta fonctionnel en contrôlant plus spécifiquement la différenciation trophoblastique, l'immunotolérance et le transport des nutriments.

En cas d'obésité maternelle, les concentrations circulantes de leptine sont augmentées et les concentrations d'adiponectine sont diminuées par rapport aux femmes normo-pondérées et ceci tout au long de la grossesse. Cependant, peu d'études se sont intéressées à l'expression

de la leptine, du récepteur LEPR et des récepteurs ADIPOR dans le placenta des femmes obèses.

L'objectif de cette étude est de mesurer l'expression de l'ARNm et des protéines des systèmes leptine/adiponectine (ligands et récepteurs) et des modifications épigénétiques (méthylation de l'ADN) sur des biopsies de placentas issus de femmes obèses comparées aux femmes non-obèses.

Résultats

La population étudiée est homogène au regard des critères d'inclusion. Nous n'observons pas de différence dans les caractéristiques maternelles (âge, taille et terme de grossesse), placentaires (poids et taille) et néonatales (poids fœtal).

La mesure de l'expression de **la leptine** (ARNm et protéine) ne montre pas de différence significative entre le groupe obèse et le groupe contrôle (normo-pondéré). Cependant, nous avons mis en évidence une expression différentielle entre les faces maternelles et fœtales du placenta. En effet, la leptine est moins exprimée du côté maternel par rapport au côté fœtal, dans les deux populations étudiées. En revanche, l'expression placentaire **du récepteur de la leptine** (protéine) est diminuée dans le groupe obèse comparé au groupe contrôle.

Nous avons également mis en évidence une diminution de l'expression du **récepteur ADIPOR1** (ARNm et protéine) dans le groupe obèse comparé au groupe contrôle. Enfin l'obésité maternelle conduit i) à une plus faible expression du **récepteur ADIPOR2** (ARNm) sur la face maternelle par rapport à la face fœtale du placenta et ii) à une diminution globale d'ADIPOR2 (protéine) dans les placentas de femmes obèses par comparaison aux femmes normo-pondérées.

Les analyses épigénétiques de méthylation de l'ADN mettent en évidence que l'obésité maternelle entraîne une augmentation de la méthylation de la région promotrice du gène de la leptine dans le placenta spécifiquement sur sa face fœtale. Pour le système adiponectine, l'obésité maternelle semble être associée à (i) une très faible méthylation de l'ADN dans la région promotrice de l'adiponectine et (ii) une augmentation de la méthylation de l'ADN de la

région promotrice du récepteur ADIPOR2 dans le placenta spécifiquement sur sa face maternelle.

Discussion

Les mécanismes moléculaires établissant un lien entre les conditions de vie fœtale et le risque potentiel de développer des pathologies à l'âge adulte sont peu connus. Le placenta est l'organe situé à l'interface entre la mère et le fœtus. Il est sous l'influence de l'environnement maternel *via* la circulation utéro-placentaire. Le placenta est donc une cible potentielle face à un environnement maternel délétère tel que l'obésité. Des études montrent que le placenta est l'organe programmeur du phénotype fœtal. Cette programmation passe en partie par des modifications épigénétiques.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux effets de l'obésité maternelle sur deux systèmes clés du développement et du fonctionnement placentaire : les systèmes leptine et adiponectine. La leptine et l'adiponectine sont des hormones dont les concentrations sériques sont très perturbées au cours de l'obésité maternelle.

Nous avons mis en évidence, sur une population homogène et ne présentant pas de complication de la grossesse (incluant le GD), que les systèmes leptine et adiponectine semblent sous exprimés dans le placenta de femmes obèses par comparaison avec des femmes non obèses. Ces résultats suggèrent que les fonctions placentaires pourraient être altérées chez les femmes obèses. Nos résultats démontrent également que l'obésité maternelle conduit à de modifications épigénétiques des régions promotrices des systèmes leptine et adiponectine dans le placenta humain à terme. Ces résultats permettent de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse adaptative du placenta à l'obésité maternelle.

Des modifications de l'épigénome au début de l'ontogenèse pourraient être un mécanisme de mémorisation de l'obésité maternelle qui pourrait être impliqué dans l'augmentation des risques de syndrome métabolique à l'âge adulte chez les enfants nés de femmes obèses.

RESEARCH

Open Access

Maternal obesity influences expression and DNA methylation of the adiponectin and leptin systems in human third-trimester placenta



Perrine Nogues¹, Esther Dos Santos^{1,2}, Hélène Jammes³, Paul Berveiller^{1,4}, Lucie Arnould¹, François Vialard^{1,5} and Marie-No  lle Dieudonn  ^{1*}

Abstract

Background: It is well established that obesity is associated with dysregulation of the ratio between the two major adipokines leptin and adiponectin. Furthermore, it was recently reported that maternal obesity has a significant impact on placental development. Leptin and adiponectin are present at the fetal-maternal interface and are involved in the development of a functional placenta. However, less is known about leptin and adiponectin's involvement in the placental alterations described in obese women. Hence, the objective of the present study was to characterize the placental expression and DNA methylation of these two adipokine systems (ligands and receptors) in obese women.

Results: Biopsies were collected from the fetal and maternal sides of third-trimester placenta in obese and non-obese (control) women. In both groups, leptin levels were higher on the fetal side than the maternal side, suggesting that this cytokine has a pivotal role in fetal growth. Secondly, maternal obesity (in the absence of gestational diabetes) was associated with (i) elevated DNA methylation of the leptin promoter on fetal side only, (ii) hypomethylation of the adiponectin promoter on the maternal side only, (iii) significantly low levels of leptin receptor protein (albeit in the absence of differences in mRNA levels and promoter DNA methylation), (iv) significantly low levels of adiponectin receptor 1 mRNA expression on the maternal side only, and (v) elevated DNA methylation of the adiponectin receptor 2 promoter on the maternal side only.

Conclusion: Our present results showed that maternal obesity is associated with the downregulation of both leptin/adiponectin systems in term placenta, and thus a loss of the beneficial effects of these two adipokines on placental development. Maternal obesity was also associated with epigenetic changes in leptin and adiponectin systems; this highlighted the molecular mechanisms involved in the placenta's adaptation to a harmful maternal environment.

Keywords: Maternal obesity, Placenta, DNA methylation, Leptin, Adiponectin

* Correspondence: marie-noelle.dieudonne@uvsq.fr
¹GIG-EA 7404, Université de Versailles-St Quentin, Université Paris-Saclay, Unité de Formation et de Recherche des Sciences de la Santé Simone Veil, 2 avenue de la Source de la Bièvre, F-78180 Montigny-le Bretonneux, France
Full list of author information is available at the end of the article



   The Author(s). 2019 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Obesity is a growing public health problem; it affects almost 30% of women of child-bearing age [1]. In particular, obesity has significant reproductive repercussions during pregnancy. When compared with non-obese women, obese women have a greater likelihood of a poor pregnancy outcome: fetal macrosomia, fetal intrauterine growth restriction (IUGR), preeclampsia, gestational diabetes (GD) mellitus, gestational hypertension, etc. [2]. Several possible mechanistic explanations for the association between obesity and a greater frequency of complications in pregnancy have been proposed. For example, it has been suggested that obesity predisposes women to a harmful, pro-inflammatory environment generated by excess adipose tissue and thus impairs placental functions [3]. It is now well-established that placenta is not just a passive tissue mediating fetal-maternal exchanges; in fact, the placenta can modify its capacity to supply nutrients in response to intrinsic factors (e.g., gestational age) and extrinsic factors (e.g., nutritional and other environmental variations) in the prevailing conditions in utero [4]. Moreover, alterations in placental morphology and functions have been observed in the context of complicated pregnancy. More precisely, excessive accumulation of macrophages and lipids, and high levels of oxidative stress have been observed in placenta sample from obese women. These alterations result in (i) the production of pro-inflammatory cytokines (including interleukin-6, tumor necrosis factor, and monocyte chemoattractant protein 1) [5], and (ii) the nitration of several proteins [6]. Uncontrolled placental inflammation and lipotoxicity impairs placental function, with elevated delivery of free fatty acids to the fetal circulation and seem to alter fetal growth and development [3]. Moreover, obesity is also associated with a decrease in the number and activity of the mitochondria in human placental cells [7, 8]. Lastly, abnormal placental angiogenesis and focal immaturity of the villous tree have also been described in women with pregravid obesity [9]. Furthermore, recent studies have clearly demonstrated that placental adaptations to a harmful maternal environment include epigenetic modifications (DNA methylation, DNA hydroxymethylation, histone acetylation, micro-RNAs, etc.) that result in fetal reprogramming during pregnancy [4, 10, 11]. More precisely, the genome regions are differentially methylated and hydroxymethylated: placental DNA methylation levels were 21% higher in an obese group (relative to a non-obese group), whereas hydroxymethylation levels were 31% lower [12].

Adipose tissue is known to synthesize and secrete many different cytokines, including leptin and adiponectin in particular [13]. Both of these adipokines regulate energy homeostasis, inflammation, angiogenesis, and immunomodulation by exerting central or peripheral

effects via their specific receptors (i.e., the leptin receptor (LEPR) and adiponectin receptors 1 and 2 (ADIPOR1/R2)) [14, 15]. Furthermore, many studies have clearly described the two adipokines' involvement in human pregnancy. Leptin and adiponectin have effectively 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 [16]. More particularly, maternal circulating levels of leptin are elevated during a normal pregnancy because the adipokine is secreted by placental cells. Maternal adiponectin levels increase during the first half of pregnancy and then fall in proportion to the weight gain [17, 18]. In a pregnancy complicated by obesity, circulating leptin concentrations are higher than normal, and circulating adiponectin concentrations are slightly lower than normal throughout pregnancy [19]. Major perturbations of the maternal leptin/adiponectin balance have been described in some pathologies of the female reproductive system, such as GD, pre-eclampsia, and fetal IUGR [20]. Furthermore, we and others have reported that leptin and adiponectin are also secreted respectively by the placenta and the endometrium, as well as by adipose tissue [21, 22]. Both adipokines seemed to favor the development of a functional placenta, with differentiative and anchoring abilities [23, 24]. Indeed, the two cytokines stimulated (i) the molecular and morphological differentiation of cytotrophoblasts into syncytiotrophoblast and (ii) trophoblast invasion from first-trimester placenta [25, 26]. Leptin and adiponectin are also involved in the regulation of immunotolerance and inflammatory processes in the placenta [16]. In fact, the two adipokines exert proinflammatory effects in third-trimester placenta. Leptin appears to be involved in the innate and adaptive immunity of placental cells because it induces the expression of human leucocyte antigen G, the well-known immunosuppressive factor, by trophoblasts [27]. Lastly, leptin and adiponectin exert opposing effects on placental amino acid uptake at term, suggesting that the two adipokines control nutrient delivery to the fetus via the placenta [28]. However, most studies of the leptin and adiponectin systems in human placenta have been performed in non-obese women. Consequently, little is known about the placental expression of leptin or adiponectin in obese women. Hence, in order to better understand the molecular mechanisms underlying placental adaptation in response to maternal obesity, the objective of the present study was to measure the mRNA and protein expression of the leptin/adiponectin systems (ligands and receptors) and epigenetic modifications (DNA methylation) in third-trimester placenta biopsies obtained from a group of obese women and a group of non-obese women.

Results

Maternal and neonatal clinical characteristics

Between January 2017 and July 2018, 30 women (age range 27–37) met all the inclusion criteria (see the “Methods” section) and were included in the study (Table 1). All had a singleton pregnancy, and there were no complications of pregnancy. The body mass index (BMI) criterion enabled us to define a control group (BMI = 21.2 ± 3.2 kg/m²) and an obese group (BMI = 35.8 ± 4.2 kg/m²; $p < 0.0001$ vs. the control group). The study population was homogeneous with regard to demographic parameters, since there were no significant intergroup differences in ethnicity, maternal age, maternal height, or gestational age at delivery. Furthermore, placental characteristics (weight, length, width, and thickness) were similar in the control and obese groups. In addition, we did not observe significant intergroup differences in neonatal characteristics (birth weight, placental weight, and the ratio birth weight/placental weight). Furthermore, a sex-specific analysis did not reveal any male vs. female differences in the neonatal parameters (data not shown). In summary, the control and obese groups did not differ markedly with regard to their placental and neonatal characteristics.

Association between obesity and leptin/leptin receptor expression levels in human third-trimester placenta

We studied the expression of leptin and its membrane receptors on the fetal and maternal sides of human term placenta in the control and obese groups. Figure 1a shows that leptin gene (*LEP*)

expression was higher on the fetal side of the placenta than on the maternal side in both the control and obese groups (by a factor of 4.4 and 5.2, respectively). Moreover, leptin gene expression tended to be lower on both the fetal and maternal sides (by a factor of 0.6 and 0.5, respectively) in placenta from the obese group than in placenta from the control group. The *LEPR* mRNA level was similar on the fetal and maternal sides in both groups (Fig. 1b). Moreover, obesity was not associated with a difference in *LEPR* mRNA expression at fetal and maternal sides of the placenta (Fig. 1b).

We also studied placental protein expression by using immunohistochemistry for leptin and immunoblotting for the *LEPR*. Semi-quantification immunostaining revealed significantly lower leptin expression on the maternal side (relative to the fetal side) in both control and obese groups (by a factor of 0.9 and 0.8, respectively). These results were consistent with the *LEP* mRNA expression levels (Fig. 1c). Furthermore, leptin protein expression in the placenta was seen to be similar in the obese and control groups. In contrast, *LEPR* protein expression levels (measured in whole placental tissue) were significantly lower (by a factor of 0.7) in the obese group than in the control group (Fig. 1d).

In summary, leptin expression was significantly lower on the maternal side of the placenta than on fetal side in both the obese and control groups. Maternal obesity did not seem to affect mRNA and protein expression of leptin by the placenta but was associated with lower protein expression of the leptin receptor.

Table 1 Maternal and neonatal clinical characteristics

Variable	Control (N = 18)	Obese (N = 12)	p value
Ethnicity	Caucasian	Caucasian	
Maternal age (years)	32 ± 3	34 ± 4	0.13
Maternal height (m)	1.6 ± 0.09	1.6 ± 0.04	0.42
Maternal weight (before pregnancy) (kg)	51.3 ± 10	98.5 ± 13	< 0.0001
BMI (before pregnancy) (kg/m ²)	21.2 ± 3.2	35.8 ± 4.2	< 0.0001
Gestational age at delivery (weeks of amenorrhea)	39 ± 1.1	38 ± 1	0.085
Placental weight (g)	669.5 ± 135.2	714.8 ± 183.1	0.27
Placental length (cm)	19.3 ± 1.9	18.6 ± 2.3	0.32
Placental width (cm)	16.7 ± 1.6	17.3 ± 1.2	0.23
Placental thickness (cm)	2.1 ± 0.8	2.7 ± 1.1	0.21
Infant's gender (% male)	50	42	0.34
Birthweight of male infants (g)	3375.56 ± 298.22	3282 ± 165.4	0.26
Birthweight of female infants (g)	3415.6 ± 541.6	3459.6 ± 418.3	0.50
Placental weight for male infants (g)	680.8 ± 132.8	670.1 ± 88.2	0.50
Placental weight for female infants (g)	653.1 ± 158.8	746.8 ± 231.1	0.34
Birthweight/placental weight ratio for male infants	5.4 ± 0.5	4.95 ± 0.52	0.09
Birthweight/placental weight ratio for female infants	5.3 ± 0.75	4.9 ± 1.2	0.20

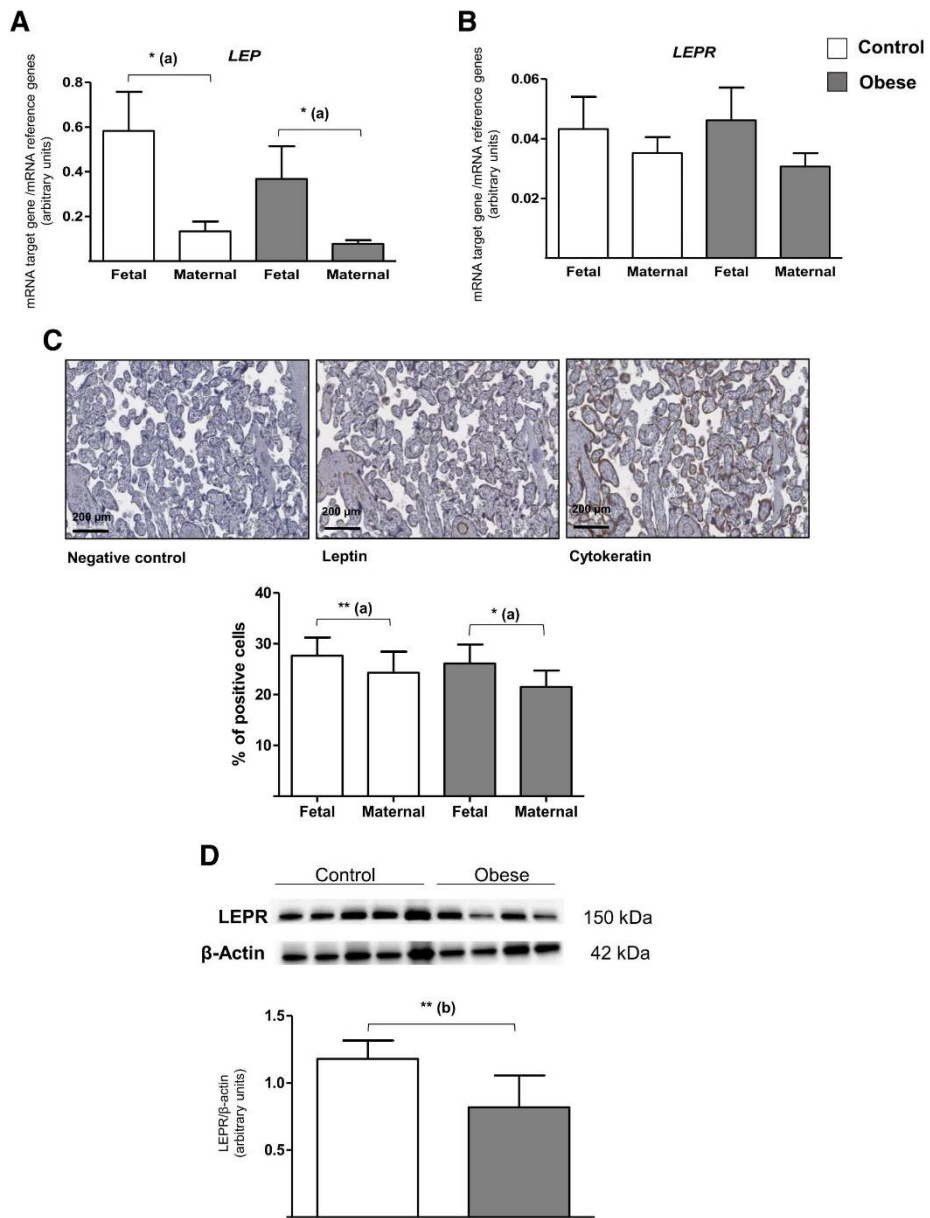


Fig. 1 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Fig. 1 LEP and LEPR expression levels in human third-trimester placental tissue. **a, b** mRNA expression of *LEP* and *LEPR*. Total RNA was extracted from the fetal and maternal sides of third-trimester placenta in control and obese women, and then analyzed using RT-qPCR. The data are quoted as the mean \pm SEM. * $p < 0.05$ in a Wilcoxon test. (a) Maternal side vs. fetal side. **c** Leptin protein expression. Third-trimester placental biopsies were fixed, embedded in paraffin, and stained for anti-leptin antibody, as described in the "Methods" section. The data are quoted as the mean \pm SEM of $N = 16$ placental sections. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ in a Wilcoxon test. (a) Maternal side vs. fetal side. **d** LEPR protein expression. Lysates of third-trimester placental biopsies from control and obese women were extracted and then subjected to Western blot analysis using an anti-LEPR or anti- β -actin antibody, as described in the "Methods" section. The data are representative of five separate experiments and are quoted as the mean \pm SEM. ** $p < 0.01$ in a Student t test. (b) The obese group vs. the control group

Association between obesity and ADIPOR1/ADIPOR2 expression levels in human third-trimester placenta

Since the adiponectin gene (*ADIPOQ*) is not expressed in placenta, we analyzed the *ADIPOR1* and *ADIPOR2* system. Figure 2a shows that *ADIPOR1* mRNA expression levels were quite similar on the fetal and maternal sides in both the control and obese groups. However, the *ADIPOR1* mRNA level of the maternal side was significantly lower (by a factor of 0.7) in the obese group than in the control group. As expected, the *ADIPOR2* mRNA level was significantly lower (by a factor of 0.04) than the level of *ADIPOR1* mRNA ($p < 0.0001$, data not shown). *ADIPOR2* mRNA expression was significantly lower (by a factor of 0.8) on the maternal side than on the fetal side in the obese group (Fig. 2b). *ADIPOR2* mRNA level was also lower on the maternal side in the control than in the obese group (by a factor of 0.7) but did not achieve statistical significance. A quantitative immunoblotting analysis of *ADIPOR1* and *ADIPOR2* revealed a lower protein expression in the obese group than in the control group, by a factor of 0.8 and 0.7 for *ADIPOR1* and *ADIPOR2*, respectively.

Association between obesity and DNA methylation of leptin/leptin receptor gene promoters in human third-trimester placenta

We analyzed the level of CpG methylation in the gene promoter regions (362 bp and 17 CpG sites for the *LEP* gene promoter, and 288 bp and 13 CpG sites for the *LEPR* promoter; Figs. 3a and 4a, respectively). As shown in Fig. 3b, the methylation levels at the 17 CpG sites in the *LEP* gene promoter ranged from 10 to 75% in placental samples from the control group. Seven CpG sites (#2, #3, #4, #5, #6, #9, and #13) were hypomethylated (<20%), and four (#7, #15, #16, and #17) were hypermethylated. We hypothesized that the two domains thus defined might have different regulatory roles. The same profile was found on both sides of the placenta, and there were no significant fetal- vs. maternal-side differences in methylation at the CpG sites analyzed. This was also the case for the mean DNA methylation level of the *LEP* promoter region for both groups. However, the mean DNA methylation level in samples from the

fetal side was significantly higher (by a factor of 1.2) in the obese group than in the control group (Fig. 3c).

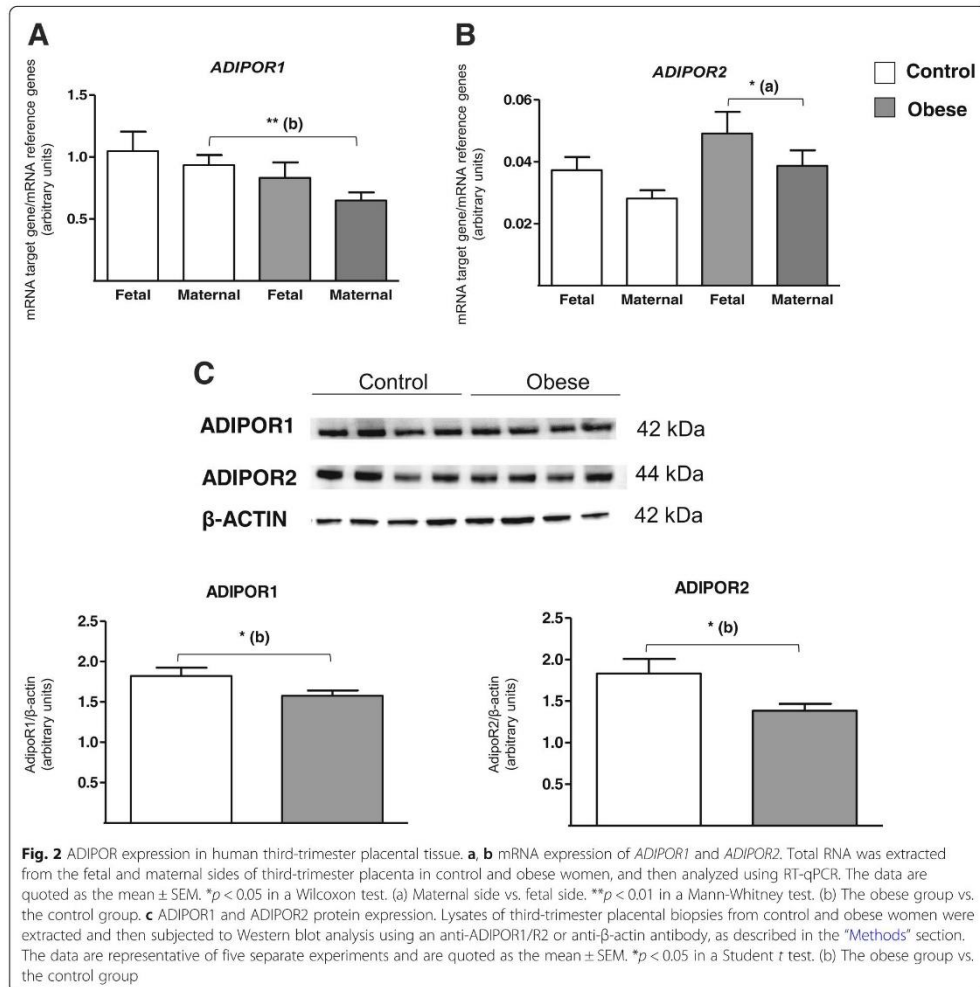
All 13 CpG sites analyzed in the *LEPR* gene promoter displayed a low level of methylation (<5%). In addition, there was no difference in methylation profile between the fetal and maternal sides of the placenta in the control group (Fig. 4b). Then, there were no significant differences in mean DNA methylation levels between the two groups and on either side of the placenta (Fig. 4c).

Thus, with regard to the leptin system, maternal obesity appears to be associated solely with elevated DNA methylation of the *LEP* gene promoter in samples from the fetal side of the placenta.

Association between obesity and DNA methylation of ADIPOQ and ADIPOR1/R2 promoters in human third-trimester placenta

Two promoter regions of 391 bp (region 1) and of 267 bp (region 2) for *ADIPOQ* were analyzed for DNA methylation at CpG level (21 and 12 CpG sites for region 1 and region 2, respectively) (Fig. 5a). Figure 5b and c shows that all CpG sites analyzed in the two *ADIPOQ* promoter regions were hypomethylated (<5%). Furthermore, the *ADIPOQ* promoter region 1 could be divided into two domains (CpG sites #1–#10 and #11–#21). The methylation level was significantly higher in the first domain than in the second in the control group ($p < 0.0020$; data not shown). Furthermore, the methylation level for the #1–#10 domains was significantly higher on the fetal side than on the maternal side in the control group ($p < 0.0020$; data not shown). This site-specific higher methylation was also observed for the #11–#21 domains ($p < 0.0010$; data not shown) (Fig. 5b).

In the *ADIPOQ* promoter region 2, the CpG sites #4, #5, and #10 appeared to be less hypomethylated than other CpG sites. Moreover, the region's methylation level was significantly higher on the maternal side than on the fetal side in the control group ($p < 0.0409$; Fig. 5c). Furthermore, the mean DNA methylation level for the *ADIPOQ* region as a whole was significantly lower (by a factor of 0.8) on the maternal side than on the fetal side in the obese group. The *ADIPOQ* methylation level on

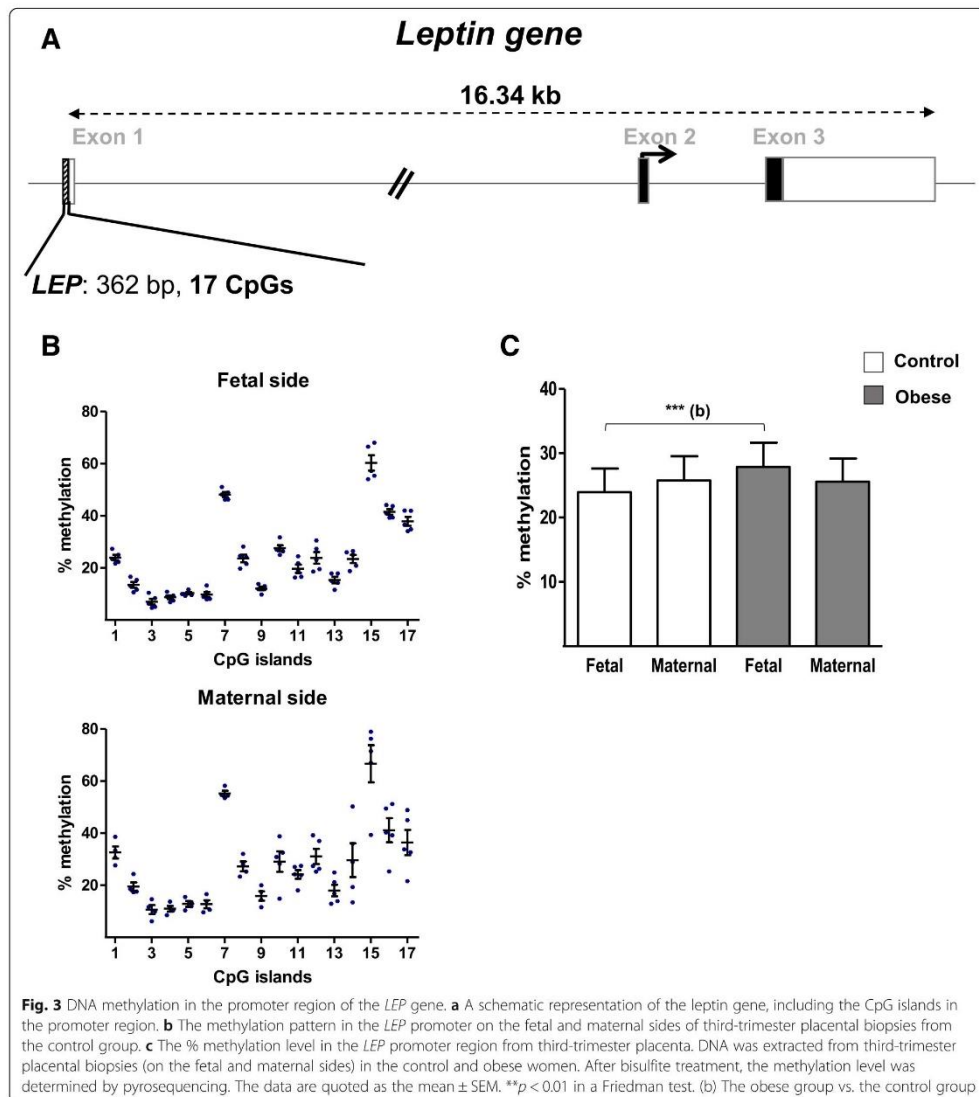


placental samples from the maternal side was lower (also by a factor of 0.8) in the obese group than in the control group.

Levels of DNA methylation were analyzed in the *ADIPOR1* promoter region (299 bp and 21 CpG sites) and the *ADIPOR2* promoter region (379 bp and 16 CpG sites) (Figs. 6a and 7a). Figures 6b and 7b show that all the analyzed CpG sites in the *ADIPOR1/2* promoter regions were hypomethylated (<5%). For *ADIPOR1*, the same methylation profile was seen on both sides of the placenta in the control group and there were no significant methylation differences at each CpG site (Fig. 6b). Figure 6c

shows that the mean methylation level was higher (by a factor of 1.5) on the maternal side than on the fetal side in the obese group. For individual CpG sites, the most significant difference was seen for #5, with 2.9-fold increases, on the maternal side than on the fetal side in the obese group (Additional file 1: Figure S1).

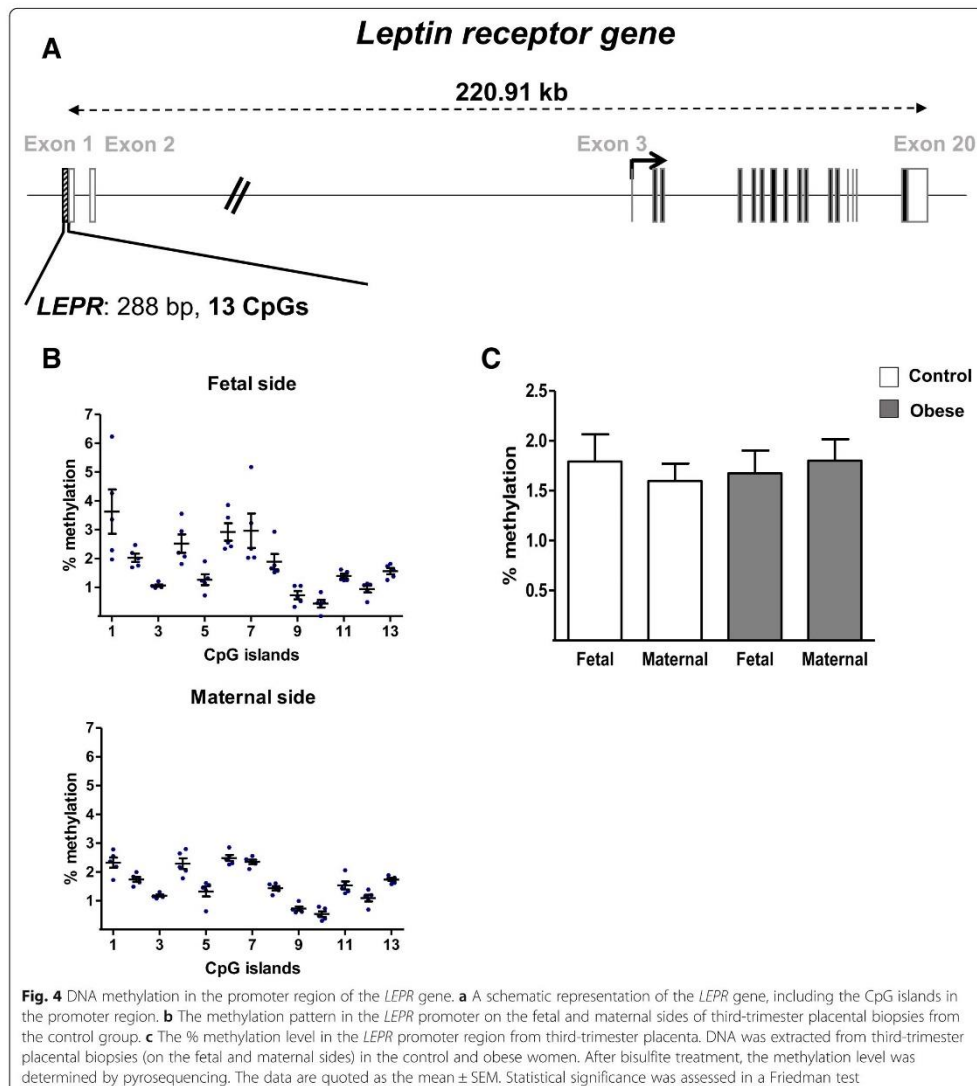
For *ADIPOR2*, the same methylation profile was seen on both sides of the placenta in the control group. Again, there were no significant fetal-vs.-maternal side methylation differences at any of the CpG sites (Fig. 7b). Figure 7c shows that the mean methylation level was significantly higher (i) on the maternal side than on the



fetal side in the obese women (by a factor of 2.2) and (ii) on the maternal side in the obese group than on the maternal side in the control group (by a factor of 2.4-fold). The elevated methylation level was more prominent for CpG site #2, with a 2.9-fold relative increase on the maternal side than on the fetal side in the obese group, and a 4.8-fold relative increase in the obese group over the

control group for the maternal side (Additional file 1: Figure S2).

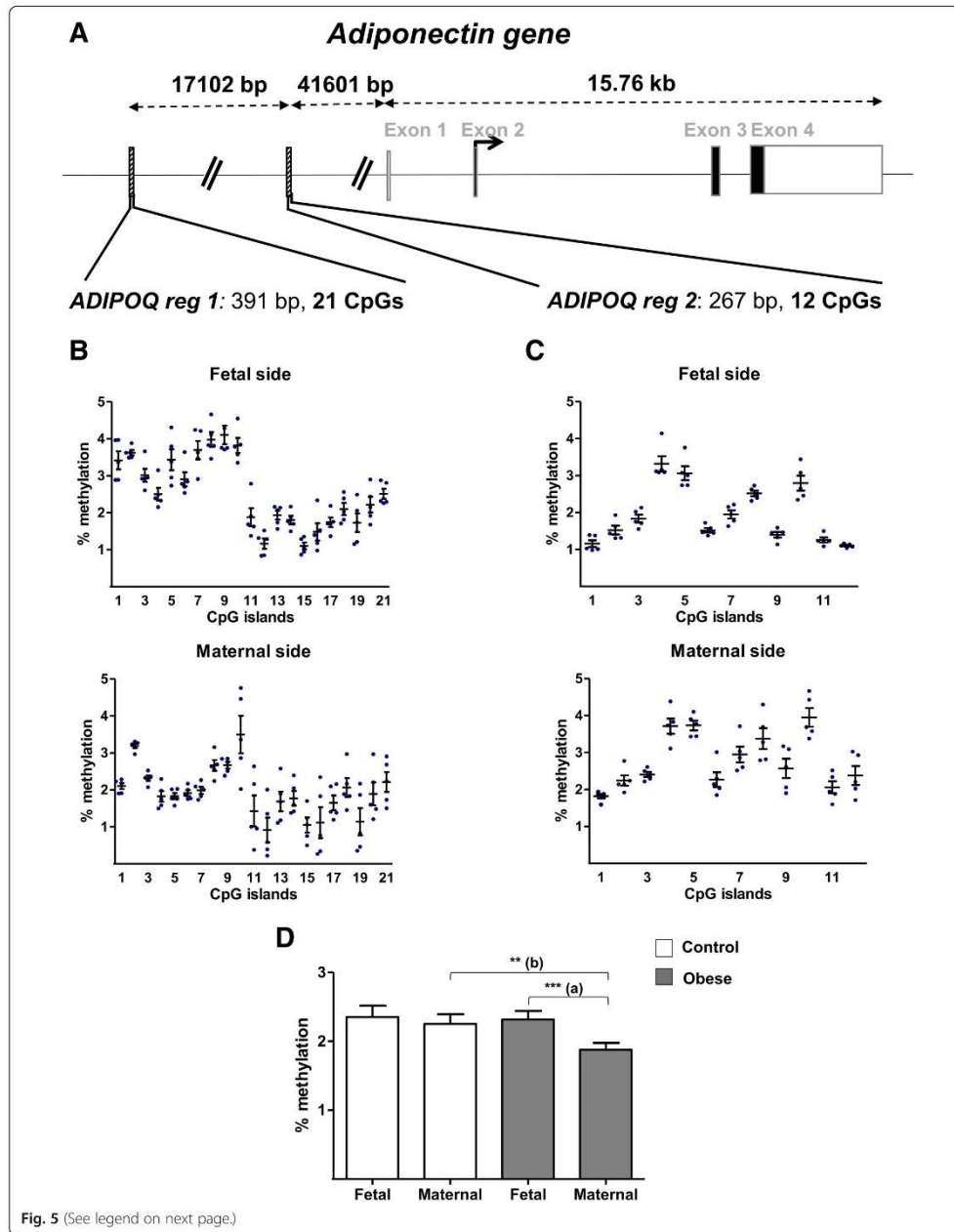
In summary, maternal obesity appears to be associated with (i) low DNA methylation in the *ADIPOQ* promoter region and (ii) elevated DNA methylation of the *ADI-POR2* promoter region in samples taken from the maternal side of the placenta.



Discussion

The intrauterine period is critical because it is thought to influence the long-term programming of energy homeostasis regulation and consequently has an important role in determining a child's susceptibility to obesity and type 2 diabetes [29, 30]. However, the molecular mechanisms linking fetal life to the potential long-term risk of developing metabolic diseases are poorly

understood. Epigenetic changes in the placental (such as DNA methylation) might be involved in this link. Indeed, a large body of literature data clearly shows that when confronted with a harmful maternal environment (such as maternal obesity), the placenta can adapt by modifying its own epigenetic programming [12, 31]. Thus, the placenta is a key regulator of fetal growth and development; it not only relays the maternal metabolic



(See figure on previous page.)

Fig. 5 DNA methylation in the promoter regions of the *ADIPOQ* gene. **a** A schematic representation of the *ADIPOQ* gene, including the CpG islands in the promoter region. **b** The methylation pattern in the *ADIPOQ* promoter region 1 (reg 1) on the fetal and maternal sides of third-trimester placental biopsies from the control group. **c** The methylation pattern in the *ADIPOQ* promoter region 2 (reg 2) on the fetal and maternal sides of third-trimester placental biopsies from the control group. **d** The % methylation level in the *ADIPOQ* promoter regions in third-trimester placenta. DNA was extracted from third-trimester placental biopsies (on the fetal and maternal sides) in the control and obese women. After bisulfite treatment, the methylation level was determined by pyrosequencing. The data are quoted as the mean \pm SEM. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ in a Friedman test. (a) Maternal side vs. fetal side. (b) The obese group vs. the control group

environment to the fetus but can also become both a target and source of pathogenic factors affecting the fetus itself [32]. Most studies of the impact of maternal obesity on placental and fetal development have been performed in obese women with GD [33–35]. One of the strengths of our study is its highly characterized cohort of women who are obese but do not suffer from diabetes or cardiovascular disease. Moreover, the ethnic homogeneity of our population helps to avoid discrepancies and possible confounding effects. The homogeneity of the population might also explain why the neonatal and placental parameters in the obese and control groups were homogeneous, relative to other studies. Although obese women may have a normal-sized placenta and give birth to babies with normal birth weight and a normal outcome in the immediate postnatal period, a programming effect on the fetus might reveal itself later in life [3].

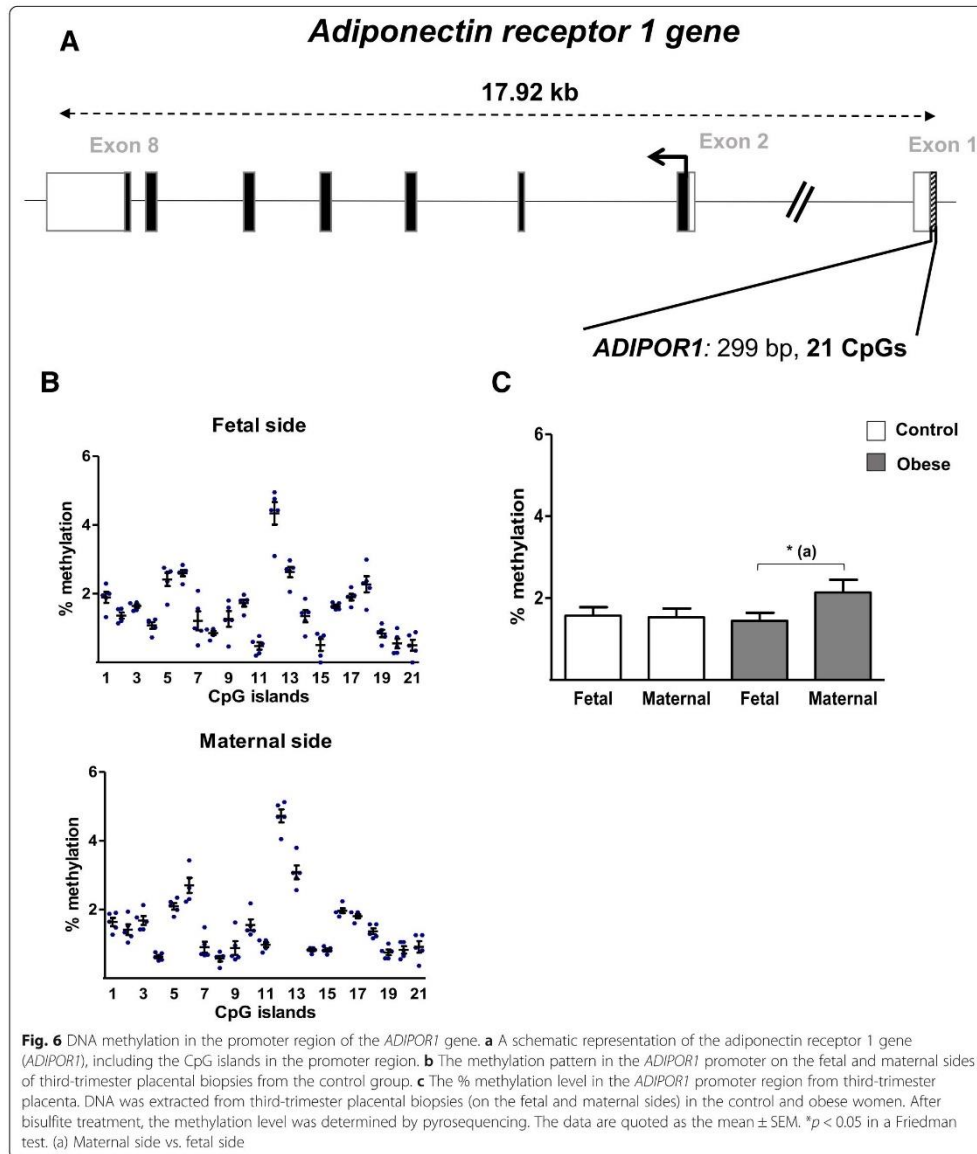
Our present study focused on leptin and adiponectin—both adipokines mainly involved in energy metabolism and the regulation of insulin sensitivity [14, 15]. Hence, leptin and adiponectin might be involved in matching the mother's energy requirements during pregnancy to the growth of the fetoplacental unit [16, 36]. Moreover, elevated leptin levels and, conversely, low adiponectin concentration have been observed in the obese state [18, 19]. In this context, we assessed the mRNA and protein expression levels of adiponectin and leptin systems in human third-trimester placenta of obese and non-obese women, with a novel focus on epigenetic regulation via the DNA methylation of the genes' respective promoter regions.

Methylation of DNA is the most extensively analyzed epigenetic marker, in view of its fundamental regulatory role in fine-tuning, the gene expression that drives cell lineage and cell fate. During the embryo's development, the trophoblastic cells acquire a unique DNA methylation profile that clearly differs from that observed in inner mass cells and in other fetal somatic cells [37]. Furthermore, DNA methylation is an attractive biomarker of health; it is relatively stable during sample processing but is sensitive to changes in a tissue's cellular composition and environment. Furthermore, Wilson et al. recently reviewed the potential of DNA methylation analysis as a placental health biomarker [38]; this emphasizes the value of our study of the methylation

status of the *LEP/LEPR/ADIPOQ/ADIPOR1/ADIPOR2* promoter regions in a context of maternal obesity.

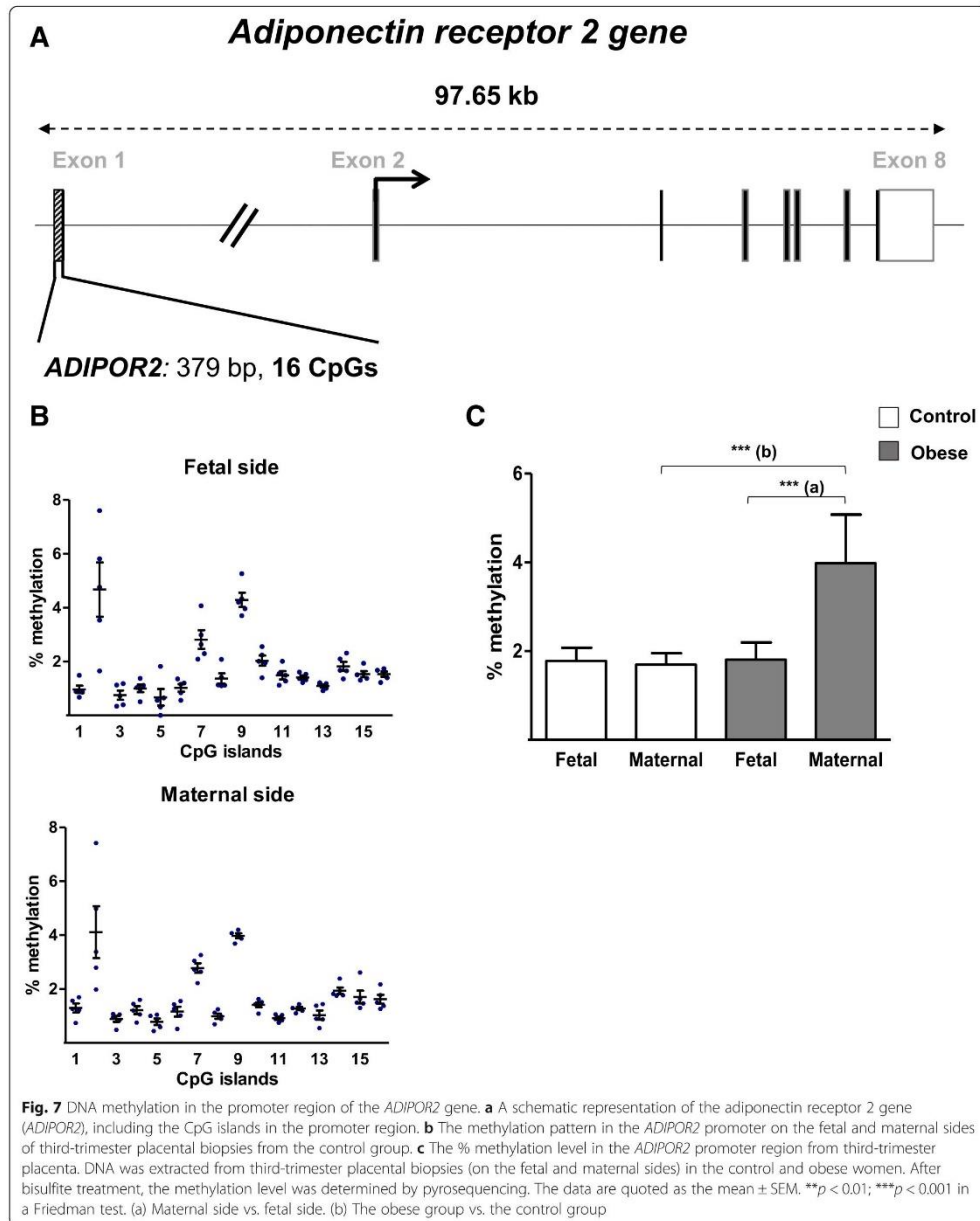
We first demonstrated that the *LEP* and *ADIPOQ* promoters were moderately methylated (< 70%) in placental samples from our study groups. These results confirm literature reports of the general hypomethylation of placental genes [31]. Low methylation levels in the trophoblast lineage seem to be indispensable for normal extraembryonic development. Moreover, literature reports also served to validate our sample set. Secondly, the present study is the first to have demonstrated that leptin expression is higher on the fetal side of the placenta than the maternal side in both obese and non-obese women. This finding suggests that leptin's well-known role as a growth factor at the fetal-maternal interface [39, 40] might extend to fetal development. A side-specific expression pattern has already been described for genes reportedly associated with preeclampsia and GD [41]. Thus, our results constitute a new example of side-specific placental expression.

The impact of maternal obesity on placental leptin expression is currently subject to debate. Although most studies did not reveal any BMI-related changes in placental leptin levels [35], a widespread transcriptomic study found that maternal obesity is associated with significantly low placental expression of leptin [42]. In the present study, we showed that maternal obesity is associated with a non-significant downregulation of placental leptin expression. However, our preliminary *in vitro* experiments revealed that leptin mRNA expression in human syncytiotrophoblast (the main placental cell) isolated from term placenta was significantly lower (by a factor of 0.3) in obese women than in control women (data not shown). Furthermore, we showed that the methylation level of the leptin promoter on the fetal side of the placenta was higher in obese women than in non-obese women. This epigenetic modification was observed in promoter regions close to transcription factor binding sites like SP1, C/EBP, and TATA-box—all of which are known to regulate leptin expression. Hence, our results are in line with other reports whereby obesity might decrease *LEP* promoter activity by decreasing the affinity of some transcription factors for their cognate binding sites [43, 44]. Moreover, Melzner et al. have demonstrated that greater methylation of the CpG sites close to SP1, C/EBP, and TATA-box decreased



LEP promoter activity in an adipose cell line [45]. Hence, we hypothesize that high levels of leptin promoter methylation in the placenta of obese women might decrease the promoter's activity and thus result in lower *LEP* mRNA

expression. However, our results disagree with those reported by Lesseur et al.; the latter researchers found that the placental DNA methylation of the *LEP* promoter was not elevated in obese women [34]. These discrepancies



might be due (at least in part) to the differences in (i) the ethnic and/or clinical characteristics of the study populations and/or (ii) the CpG islands analyzed.

Furthermore, we observed significantly lower placental LEPR protein expression in the obese group than in the non-obese women. This finding is consistent with previous reports and reveals the establishment of an adaptive placental leptin resistance in response to maternal hyperleptinemia [34, 46, 47]. Although we did not observe mRNA regulation or epigenetic modifications of the LEPR promoter, we hypothesize that LEPR protein expression was controlled by a post-transcriptional mechanism—as has already been observed in various tissues and cell types [48, 49]. Our data on the leptin system clearly show low expression of both the ligand and the receptor, which is likely to downregulate leptin's biological effects in the placenta of obese women.

With regard to adiponectin, we and others have shown that the placenta itself does not express this adipokine [26, 50]. In the present study, we found that the ADIPOQ promoter was hypomethylated in placental samples. This finding suggests that placental adiponectin expression is controlled by other epigenetic modifications (such as short-term, flexible silencing via repressive histone modification, which is important for developmental plasticity), rather than by DNA methylation [11]. The methylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27) in human placenta was recently described [51]. Hence, we speculate that H3K27 methylation might be involved in the placental expression of adiponectin. Further experiments are in progress in our laboratory. Lastly, we showed that in human placenta, *ADIPOR2* is 10- to 100-fold less expressed than *ADIPOR1*, as generally described in other tissues and cell types [52, 53]. Interestingly, we observed that maternal obesity is associated with a significantly lower *ADIPOR1* mRNA expression on the maternal side of the placenta and a significantly lower *ADIPOR1* protein expression in the whole placental tissue. Our findings confirm and complete literature data from a general analysis of the human placenta [42]. Furthermore, our present study is the first to have described significantly lower *ADIPOR2* mRNA expression on the maternal side of the placenta than on the fetal side of the placenta in obese women; this may have been due to greater DNA methylation of the *ADIPOR2* promoter. However, the molecular mechanisms underlying the regulation of the *ADIPOR2* promoter have not been characterized. Moreover, we observed lower protein levels of *ADIPOR2* in the placenta of obese women, relative to non-obese women. Taken as a whole, our results suggest that these differences in expression may have functional consequences by downregulating the biological signals transmitted by *ADIPORs* in the placenta of obese women.

Conclusions

In summary, the leptin and adiponectin systems (i.e., ligands and receptors) are downregulated in the placenta in obese pregnant women, relative to non-obese pregnant women. Given that leptin and adiponectin actively participate in the establishment of morphologically and functionally competent placenta with nutritive, secreting, and anchoring abilities, one can legitimately hypothesize that these placental functions are altered in obese women. Further investigations are underway in our laboratory. Our results also provide a better understanding of the molecular mechanisms (and the epigenetic modifications, more specifically) involved in the placental adaptive response to maternal obesity. Changes in the epigenome early in ontogenesis could be a mechanism of memorization of the maternal obesity, contributing to particular gene expression profiles and thus increase the risk of metabolic syndrome in adulthood.

Methods

Materials

The RNA stabilization solution (RNAlater), Pyromark PCR kit, and Pyromark Gold 96 Reagents kit were purchased from Qiagen (Hilden, Germany). The Nucleospin RNA II kit was obtained from Macherey-Nagel (Düren, Germany). Superscript II RNase H-RT, primers, and NovexWedgeWell™ 4–20% Tris-Glycine gel were from Invitrogen (Carlsbad, USA), and RNase inhibitor was obtained from AMRESCO (Solon, USA). The Protein Assay Dye Reagent Concentrate Bradford was purchased from BioRad (München, Germany). Polyclonal goat anti-*ADIPOR1* (sc-46749), anti-*ADIPOR2* (sc-46756), and mouse anti-leptin (sc-48408) antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA). The rabbit polyclonal anti-LEPR (ab104403) antibody was obtained from Abcam (Cambridge, UK). The mouse monoclonal anti-cytokeratin pan-antibody (KL1) was sourced from Dako Cytomation (Glostrup, Denmark). DyNAmo ColorFlash SYBR Green and the SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate detection kit were obtained from Fisher Scientific (Waltham, USA). The SPlink Broad kit with DAB chromogen was purchased from GBI Labs Golden Bridge International (Bothell, USA). The Wizard DNA Clean-Up system was bought from Promega (Madison, USA).

The study population

Women aged between 27 and 37, with a singleton pregnancy, no complications of pregnancy (such as pre-GD and GD), and cesarean delivery were enrolled after the provision of written informed consent. The main inclusion criterion was a first-trimester BMI of 18–25 kg/m² for the non-obese (control) group and 30–40 kg/m² for the obese group. Samples of peripheral blood, cord

blood, and placenta were collected from 30 women undergoing elective cesarean delivery at 37 to 41 weeks of amenorrhea. Screening for pre-GD and GD was based on international and French national guidelines. Women with a high risk of GD generally have a personal or family (first-degree) history of diabetes, a history of GD or fetal macrosomia in a previous pregnancy, and a body mass index (BMI) > 25 kg/m², and are aged over 35 [54]. This screening protocol also includes a fasting blood glucose (FBG) assay during the first trimester of pregnancy. Gestational diabetes was defined according to the thresholds published by the International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups [55]. During the first trimester of pregnancy, women with an FBG level of 5.1 mmol/L (92 mg/dL) or more but less than 7.0 mmol/L (126 mg/dL) were considered to have GD. Women with an FBG level of 7.0 mmol/L or more were considered to have preexisting (pre-pregnancy) diabetes. If the FBG level was normal, a 75 g oral glucose tolerance test was then performed at between 24 and 28 weeks. In the test, women with an FBG level of 5.1 mmol/L or more and plasma glucose concentration values of around 10 mmol/L (180 mg/dL) at 1 h and around 8.5 mmol/L (153 mg/dL) at 2 h were also considered to have GD. All women with one or more above-normal measurements were considered to have GD and were treated according to the same protocol. Whenever GD was diagnosed, women were referred to our diabetology department for medical care.

Placenta tissue sampling

Placenta tissue was sampled within 15 min of cesarean section by experienced clinicians. Tissue biopsies were collected from both the fetal and maternal sides of the placenta. The fetal side consisted of intervillous tissues and chorionic villi. The maternal side consisted mainly of fetal villous tissues but also contained some tissue of maternal origin (decidual basalis). Whenever possible, the analyses were performed using maternal and fetal side samples independently.

Total RNA extraction and reverse transcription

Human term placental biopsies were collected, placed in RNA stabilization solution, and stored at -80 °C until use. Around 30 to 40 mg of placental tissue (from the fetal and maternal sides) were disrupted in the lysis buffer from the RNeasy kit. Total RNA was then extracted using the RNeasy kit, according to the manufacturer's instructions. The quantity and quality of the extracted RNA were measured using an Infinite M200 system (Tecan, Männedorf, Switzerland). Total RNA was stored at -80 °C until use. Subsequently, 1 µg of total RNA was reverse-transcribed into complementary DNA (cDNA)

using random primers. An incubation in the absence of reverse transcriptase was always performed to control for possible contamination by genomic DNA. The cDNA was stored at -20 °C until use.

Real-time PCR

Quantitative PCR was performed using a C1000 Thermal Cycler (the CFX96 real-time system; BioRad, Hercules, CA) and the primer sets indicated in Table 2. The second derivative maximum method was used to automatically determine the crossing point (Cp) for individual samples. The three reference genes (coding for ribosomal protein L13A, TATA-binding protein, and B2-microglobulin) had been tested for their stable expression. For each sample, the concentration ratios (target/three reference mRNAs) were calculated using CFX Manager software (version 3.0, BioRad, Hercules, CA) and expressed in arbitrary units. The data were expressed as a percentage of the control value. 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 Cp values never exceeded 0.2 cycles, and the inter-assay variability (coefficient of variation) ranged from 1.9 to 4.1% for 8 to 10 runs of each transcript.

Immunoblotting

Equal amounts of human term placental biopsies (300 mg) were lysed on ice in buffer containing 20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 1% Nonidet P40, 1% glycerol, 1 mM sodium orthovanadate, 30 mM beta-glycerophosphate, 100 µg/ml 4-(2-aminoethyl) benzene-sulfonyl fluoride hydrochloride, and a cocktail of anti-proteases and anti-phosphatases (5 µg/ml aprotinin, 12.5 µg/ml leupeptin, and 10 mM NaF). Next, the lysates were centrifuged at 12000×g for 20 min at 4 °C. The supernatant was collected and the protein concentration

Table 2 Primers used for RT-PCR

Primer set	Sequence (5'-3')	PCR product (bp)
LEP	F: TCC ACA CAC GCA GTC AGT CTC	107
	R: CTG CCA GTG TCT GGT CCA TC	
LEPR	F: TGG AAG GAG TGG GAA AAC CAA	217
	R: TTA AGT CCT TGT GCC CAG GAA	
ADIPOR1	F: TTC TTC CTC ATG GCT GTG ATG T	71
	R: AAG AAG CGC TCA GGA ATT CG	
ADIPOR2	F: ATA GGG CAG ATA GGC TGG TTG	76
	R: GGA TCC GGG CAG CAT ACA	
B2M	F: TGC TGT CTC CAT GTT TGA TGT ATC T	86
	R: TCT CTG CTC CCC ACC TCT AAG T	
RP13	F: CCT GGA GGA GAA GAG GAA AGA GA	125
	R: TTG AGG ACC TCT GTG TAT TGT CAA	
TBP	F: TGC ACA GGA GCC AAG AGT GAA	132
	R: CAC ACT ACA GCT CCC CAC CA	

was measured in a Bradford assay using bovine serum albumin (BSA) as the standard. The supernatant was then diluted in Laemmli buffer (1:1). Each cell extract (50 µg) was subjected to SDS-PAGE gel electrophoresis (4–20% Tris-Glycine). The proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane and blocked in Tris-buffered saline Tween 20 (TBST) 1× buffer (20 mM Tris, 137 mM NaCl, and 0.1% Tween 20) with 2.5% gelatin or 5% BSA for 2 h. Next, the membranes were incubated overnight at room temperature with goat polyclonal anti-AdipoR1 (1:300) or anti-AdipoR2 (1:300) primary antibodies in TBST 1× buffer with 2.5% gelatin or overnight at 4 °C in 5% BSA with rabbit polyclonal anti-LEPR (1:2000). The resulting blots were washed with TBST 1× buffer and incubated with peroxidase-conjugated secondary antibody (1:10000 dilution in TBST 1X buffer) for 1 h at room temperature, and then washed abundantly. Lastly, enhanced chemiluminescence (from the SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate detection kit) was used for signal detection. To confirm that all samples contained an equal amount of proteins, membranes were reblotted with standard β-actin antibody (1:500) in TBST 1× buffer with 5% milk. The data were analyzed using Rasband WS. ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, USA).

Immunohistochemistry

Placentas were sectioned in the vertical plane (from the maternal to the fetal sides), fixed in paraformaldehyde (4%), embedded in paraffin, and cut into 5-µm sections. Deparaffinized sections were heated in 10 mM citrate buffer for 5 min at 160 W in a microwave oven and then left for 20 min at room temperature to heat-induce epitope retrieval. Endogenous peroxidase activity was blocked by incubation with 3% H₂O₂, and non-specific IgG binding sites were blocked by incubation with 5% milk for 20 min. The slides were then incubated with primary human anti-leptin antibody (1:50) overnight at 4 °C in PBS with 5% milk. Mouse monoclonal anti-cytokeratin pan-antibody (KL1;1:120) was applied for 20 min at room temperature, in order to characterize trophoblast cells. After extensive washing, the sections were incubated with secondary biotinylated antibody for 20 min at room temperature. Thereafter, peroxidase-conjugated streptavidin was applied for 10 min at room temperature. Visualization was achieved by DAB detection, according to the manufacturer's instructions. Lastly, slides were counterstained with hematoxylin for 1 min. For negative controls, sections were processed in the absence of primary antibody. Digital images of DAB-stained placenta slides were obtained at a magnification of × 20, using a whole-slide scanner (Aperio ScanScope AT2; Leica Biosystems, Germany). Specific immunostaining was quantified on the maternal and fetal sides separately, using the positive pixel count algorithm in Aperio ImageScope software (Leica Biosystems).

Extraction of genomic DNA

Around of 100–200 g of placental tissue was used for genomic DNA extraction. The samples were hand-crushed in liquid nitrogen, and then incubated at 55 °C overnight in 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.2% SDS, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA buffer in the presence of 0.2 mg/ml proteinase K. After incubation in the presence of RNase (final concentration 25 µg/ml) for 60 min at 37 °C and then again in the presence of proteinase K (0.2 mg/ml) for 90 min at 42 °C, the samples were extracted twice with phenol/chloroform (1:1). After centrifugation at 10000×g and 4 °C for 5 min, the aqueous phase was collected. Genomic DNA was precipitated in 0.2 M NaCl and 100% ethanol (1:2.5 v/v) overnight at –20 °C. After centrifugation (at 10000×g and 4 °C for 45 min), the genomic DNA pellet was washed in 70% ethanol, dried, and resuspended in Tris-EDTA buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA). The DNA's concentration and purity were measured using a Nanodrop 2000 system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), and the integrity was checked using agarose gel electrophoresis. The genomic DNA samples were stored at –20 °C until use.

Bisulfite conversion of genomic DNA

Genomic DNA samples (1 µg) were submitted to bisulfite conversion, according to a previously described method [56]. Briefly, genomic DNA was denatured for 5 min at 90 °C, and then for 15 min at 37 °C in the presence of a final concentration of 0.2 N NaOH. Bisulfite conversion was performed using fresh bisulfite solution (5 M sodium bisulfite, 130 mM hydroquinone, and 0.35 N NaOH) for 4 h at 55 °C. Bisulfite-converted DNA was purified using the Wizard DNA Clean-Up system, according to the manufacturer's instructions. The bisulfite-converted DNA was eluted by 40 µl of hot water. The alkali desulphonation was obtained in presence of 0.3 N NaOH (15 min at 37 °C). The bisulfite DNA was precipitated in ammonium acetate and ethanol. After centrifugation (15,000×g at 4 °C, for 45 min) and washing, the bisulfite-converted DNA was dissolved in Tris-EDTA buffer, stored at –20 °C, and analyzed soon afterwards.

PCR amplification, pyrosequencing, and DNA methylation analysis

Pyrosequencing is a quantitative, real-time sequencing technology that measures the DNA methylation levels (in %) at each CpG site in a given genomic region. Using bisulfite-converted DNA, PCR amplification was performed with specific primers designed using MethylPrimer Express software (version 1.0, Thermo Fisher Scientific). In the present study, we analyzed the promoter regions of the genes coding for leptin (LEP), adiponectin (*ADIPOQ*), and their specific receptors *LEPR*, *ADIPOR1*, and *ADIPOR2*. The regions analyzed were

Table 3 Selected regions, reference, location, PCR amplification primers, PCR template size, pyrosequencing primers, and number of CpG sites analyzed

Gene symbol	Ensembl accession number	Selected regions Start-End	PCR Primer sequences 5'-3' (bp)	PCR product size (bp)	Pyrosequencing primer sequences 5'- 3' (bp)	CpG sites included
<i>Leptin (LEP)</i>	ENSG00000174697	Chr7: 128,241,050 Chr7: 128,241,412	F: ATTTTGGGAGGTATTTAAGGG R: ACATCCCTCCTAACTCAATTT	362	Pyro1: GTTATTTGGAGGG Pyro2: TTATAAGAGGGG	#17
<i>Adiponectin (ADIPOQ)</i>	ENSG00000181092	Reg1: Chr3: 186783987 Chr3: 186,784,378	F: GGAGGGTTTTAGGTTTTATTGG R: ACCACCTCAACTACACCTTAAA	391	Pyro1: TGGGGAAGGTTGGAGGTA Pyro2: GTATTGTGGGGG	#21
		Reg2: Chr3: 186801089 Chr3: 186,801,356	F: GTTTTGGGAGGAGAGAGAAAG R: CCRCAAAAAACAACCTCTC	267	Pyro1: TTTAGGGAGAAAAAGAAGA Pyro2: GTAGTATTAAAGAGGAG	#12
<i>Leptin receptor (LEPR)</i>	ENSG00000116678	Chr1: 65,420,597 Chr1: 65,420,959	F: TTTGGTTGGGTAGGTGT R: AAAAAACCAAACTCCCC	288	Pyro1: TTTGGTTGGGTAGGTGT Pyro2: GTTAAAGGTATAT	#13
<i>Adiponectin receptor 1 (ADIPOR1)</i>	ENSG00000159346	Chr1: 202,957,739 Chr1: 202,958,035	F: TGGTAATTTAATGYGGTTGTT R: CCTAACCTCAACATCCA	299	Pyro1: TGGTAATTTAATGYGGTTGTT Pyro2: GTAGTATTATAGGATTGT	#21
		<i>Adiponectin receptor 2 (ADIPOR2)</i>	ENSG00000006831	Chr12: 1,691,140 Chr12: 1,691,555	F: TAGYGGTGGTTTTAAGAAGT R: AACTAAAAACAACCCRAA	379

F forward, R reverse

defined according to different criteria: (i) the detection of CpG islands using ENSEMBL (<https://www.ensembl.org/index.html>), the UCSC Genome Browser (created by the Genome Bioinformatics Group at UC Santa Cruz; <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) and the Eukaryotic Promoter Database (created by the Swiss Institute of Bioinformatics; <https://epd.vital-it.ch/index.php>) and (ii) the presence of CCCTC-binding factor sites using ENSEMBL. CCCTC-binding factor is an important regulatory factor that is sensitive to the DNA methylation level. Moreover, for the chosen leptin and adiponectin promoter regions, we referred to the literature data published by Bouchard et al. [33, 43, 57]. The gene promoter regions and the number of CpG sites analyzed are described in Table 3.

Bisulfite-converted DNA (around 50 ng) was amplified in a final 25 μ L volume using the Pyromark PCR kit, in accordance with the manufacturer's recommendations. Next, 20 μ L of PCR product was used for pyrosequencing with the Pyromark Gold Q24 Reagents kit and the PyroMark Q24 pyrosequencer, according to the manufacturer's instructions. For each region, pyrosequencing runs were performed in duplicate. When a duplicate yielded an inconsistent % methylation (more than a 5% difference), the assay was repeated in duplicate. The % methylation per CpG was then obtained by calculating the mean of the replicates that passed the quality control using Pyromark Q24 software (version 1.0, Qiagen, Hilden, Germany).

Statistical analyses

All values were expressed as the mean \pm SEM. For the clinical characteristics, intergroup differences were probed using a Mann-Whitney test. Wilcoxon's matched-pairs test was used for mRNA expression (to compare placental sides), leptin protein expression, and also for individual CpG values. Mann-Whitney test was used for mRNA expression and individual CpG values to compare control and obese groups. Student *t* test was used for

ADIPOR1-R2 and LEPR protein expressions to compare control and obese groups. Friedman's test was used for DNA methylation analyses. All statistical analyses were performed with GraphPad Prism software (version 5.0, GraphPad, La Jolla, USA).

Additional file

Additional file 1: Figure S1. DNA methylation in the promoter region of the *ADIPOR1* gene in obese placenta. The methylation pattern in the *ADIPOR1* promoter on the fetal and maternal sides of third-trimester placental biopsies from the obese group. The data are quoted as the mean \pm SEM. *, $p < 0.05$ for #5 in a Wilcoxon test. Maternal side vs. fetal side in the obese group. Figure S2. DNA methylation in the promoter region of the *ADIPOR2* gene in obese placenta. The methylation pattern in the *ADIPOR2* promoter on the fetal and maternal sides of third-trimester placental biopsies from the obese group. The data are quoted as the mean \pm SEM. *, $p < 0.05$ for #2 in a Wilcoxon test on Maternal side vs. fetal side in the obese group. **, $p < 0.01$ for #2 in a Mann-Whitney test. Maternal side in the obese group vs. the control group. (PPTX 180 kb)

Abbreviations

ADIPOQ: Adiponectin; ADIPOR: Adiponectin receptor; BMI: Body mass index; BSA: Bovine serum albumin; CpG: Cytosine phosphoguanosine; FBG: Fasting blood glucose; GD: Gestational diabetes; IUGR: Intra-uterine growth restriction; LEP: Leptin promoter; LEPR: Leptin receptor promoter; TBST: Tris-buffered saline Tween 20

Acknowledgements

The authors thank the staff at the Department of Gynaecology and Obstetrics at CHI Poissy-Saint-Germain-en-Laye for kindly providing human placental tissue. We thank the ER5 group at the BDR (INRA) for technical support.

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 (Montigny-le-Bretonneux, France), and the Maternité et Médecine de la Reproduction Association, based at the CHI de Poissy-Saint-Germain-en-Laye (Poissy, France).

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during the study are included in this article.

Authors' contributions

PN, MND, and HJ designed the experiments. PN and LA performed the experiments. PB provided human placental tissue for experiments. PN, MND,

and HJ analyzed the data. PN, MND, and EDS wrote the manuscript. FV obtained the research funding. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

The present study was approved by the local investigational review board (*Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Médicale*; reference protocol 01–78). All participants provided their written informed consent prior to tissue sampling.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹GIG-EA 7404, Université de Versailles-St Quentin, Université Paris-Saclay, Unité de Formation et de Recherche des Sciences de la Santé Simone Veil, 2 avenue de la Source de la Bièvre, F-78180 Montigny-Le-Bretonneux, France. ²Service de Biologie Médicale, Centre Hospitalier de Poissy-Saint-Germain-en-Laye, Poissy, France. ³UMR BDR, INRA, ENVA, Université Paris Saclay, Jouy en Josas, France. ⁴Service de Gynécologie-Obstétrique, Centre Hospitalier de Poissy-Saint-Germain-en-Laye, Poissy, France. ⁵Département de Biologie de la Reproduction, Cytogénétique, Centre Hospitalier de Poissy-Saint-Germain-en-Laye, Poissy, France.

Received: 29 October 2018 Accepted: 9 January 2019

Published online: 07 February 2019

References

- Kim SY, Dietz PM, England L, Morrow B, Callaghan WM. Trends in pre-pregnancy obesity in nine states, 1993–2003. *Obesity*. 2007;15:986–93. <https://doi.org/10.1038/oby.2007.621>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2014.09.007>.
- Myatt L, Maloyan A. Obesity and placental function. *Semin Reprod Med*. 2016;34:042–9. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1570027>.
- Sandovici I, Hoelle K, Angiolini E, Constância M. Placental adaptations to the maternal–fetal environment: implications for fetal growth and developmental programming. *Reprod BioMed Online*. 2012;25:68–89. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.03.017>.
- Chailier J, Basu S, Bintein T, Hotmiro K, Miniun J, Catalano P, et al. Obesity in pregnancy stimulates macrophage accumulation and inflammation in the placenta. *Placenta*. 2008;29:274–81. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2007.12.010>.
- Roberts VJH, Smith J, McLea SA, Heizer AB, Richardson JL, Myatt L. Effect of increasing maternal body mass index on oxidative and nitrate stress in the human placenta. *Placenta*. 2009;30:169–175. [doi:https://doi.org/10.1016/j.placenta.2008.11.019](https://doi.org/10.1016/j.placenta.2008.11.019).
- Hastie R, Lapps M. The effect of pre-existing maternal obesity and diabetes on placental mitochondrial content and electron transport chain activity. *Placenta*. 2014;35:673–83. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.06.368>.
- Holland O, Dekker Nitert M, Gallo LA, Vejzovic M, Fisher JJ, Perkins AV. Review: placental mitochondrial function and structure in gestational disorders. *Placenta*. n.d. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2016.12.012>.
- Loardi C, Falchetti M, Prefumo F, Facchetti F, Frusca T. Placental morphology in pregnancies associated with pregravid obesity. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2016;29:2611–6. <https://doi.org/10.3109/14767058.2015.1094792>.
- Elshenawy S, Simmons R. Maternal obesity and prenatal programming. *Mol Cell Endocrinol*. 2016;435:2–6. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.07.002>.
- Vaiman D. Genes, epigenetics and miRNA regulation in the placenta. *Placenta*. 2017;52:127–33. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2016.12.026>.
- Mitsuya K, Parker AN, Liu L, Ruan J, Vissers MCM, Myatt L. Alterations in the placental methylome with maternal obesity and evidence for metabolic regulation. *PLoS One*. 2017;12:e0186115. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186115>.
- Kuryzsko J, Slawuta P, Sapikowski G. Secretory function of adipose tissue. *Pol J Vet Sci*. 2016;19:441–6. <https://doi.org/10.1515/pjvs-2016-0056>.
- Li S, Li X. Leptin in normal physiology and leptin resistance. *Sci Bull*. 2016; 61:1480–8. <https://doi.org/10.1007/s11434-015-0951-4>.
- Wang ZV, Scherer PE. Adiponectin, the past two decades. *J Mol Cell Biol*. 2016;8:93–100. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjw011>.
- Dos SE, 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;2:447–63. <https://doi.org/10.1515/hmbci-2015-0031>.
- Lekva T, Roland MCP, Michelsen AE, Friis CM, Aukrust P, Bollerslev J, et al. Large reduction in adiponectin during pregnancy is associated with large-for-gestational-age newborns. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102:2552–9. <https://doi.org/10.1210/clinem.2017-00289>.
- Mitanchez D, Jacqueminet S, Nizard J, Tanguy M-L, Ciangura C, Lacorte J-M, et al. Effect of maternal obesity on birthweight and neonatal fat mass: a prospective clinical trial. *PLoS One*. 2017;12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181307>.
- Pagano C, Marin O, Calcagno A, Schiappelli P, Pilon C, Milan G, et al. Increased serum resistin in adults with Prader-Willi syndrome is related to obesity and not to insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:4335–40. <https://doi.org/10.1210/clinem.2005-0293>.
- Miehle K, Stepan H, Fasshauer M. Leptin, adiponectin and other adipokines in gestational diabetes mellitus and pre-eclampsia. *Clin Endocrinol*. 2012;76:2–11. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2011.04234.x>.
- 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.
- 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;97:771–778.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.12.042>.
- Gonzalez RR, Devoto L, Campana A, Bischof P. Effects of leptin, interleukin-1 α , interleukin-6, and transforming growth factor- β on markers of trophoblast invasive phenotype. *Endocrine*. 2001;15:157–64. <https://doi.org/10.1385/ENDO:15:2:157>.
- Benaitreau D, Santos ED, 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. <https://doi.org/10.1677/JOE-10-0170>.
- Ge YC, Li JN, Ni XT, Guo CM, Wang WS, Duan T, et al. Cross talk between cAMP and p38 MAPK pathways in the induction of leptin by hCG in human placental syncytiotrophoblasts. *Reproduction*. 2011;142:369–75. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0053>.
- Benaitreau D, Santos ED, 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. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-128>.
- Barrientos G, Toro A, Moschansky P, Cohen M, García MG, Rose M, et al. Leptin promotes HLA-G expression on placental trophoblasts via the MEK/Erk and PI3K signaling pathways. *Placenta*. 2015;36:419–26. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.01.006>.
- Hauguel-de Mouzon S, Lepercq J, Catalano P. The known and unknown of leptin in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;194:1537–45. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2005.06.064>.
- Catalano PM. Obesity and pregnancy—the propagation of a viscous cycle? *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:3505–6. <https://doi.org/10.1210/clinem.2003-031046>.
- Catalano PM, McIntyre HD, Cruickshank JK, McCance DR, Dyer AR, Metzger BE, et al. The hyperglycemia and adverse pregnancy outcome study: associations of GDM and obesity with pregnancy outcomes. *Diabetes Care*. 2012;35:780–6. <https://doi.org/10.2337/dc11-1790>.
- Nomura Y, Lambertini L, Rialdi A, Lee M, Mystal EY, Grabie M, et al. Global methylation in the placenta and umbilical cord blood from pregnancies with maternal gestational diabetes, preeclampsia, and obesity. *Reprod Sci*. 2014;21:131–7. <https://doi.org/10.1177/1933719113492206>.
- Liguori A, D'Armiato FP, Palagiano A, Balestrieri ML, Williams-Ignarro S, de Nigris F, et al. Effect of gestational hypercholesterolemia on omental vasoreactivity, placental enzyme activity and transplacental passage of normal and oxidised fatty acids. *BJOG Int J Obstet Gynaecol*. 2007;114:1547–56. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2007.01510.x>.
- Bouchard L, Hivert M-F, Guay S-P, St-Pierre J, Perron P, Brisson D. Placental adiponectin gene DNA methylation levels are associated with mothers' blood glucose concentration. *Diabetes*. 2012;61:1272–80. <https://doi.org/10.2337/db11-1160>.

34. Lesseur C, Armstrong DA, Paquette AG, Li Z, Padbury JF, Marsit CJ. Maternal obesity and gestational diabetes are associated with placental leptin DNA methylation. *Am J Obstet Gynecol*. 2014;211:654.e1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2014.06.037>.
35. Martino J, Seburt S, Segura MT, García-Valdés L, Florido J, Padilla MC, et al. Maternal body weight and gestational diabetes differentially influence placental and pregnancy outcomes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101:59–68. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-2590>.
36. Pérez-Pérez A, Toro A, Vilarinho-García T, Maymó J, Guadix P, Dueñas JL, et al. Leptin action in normal and pathological pregnancies. *J Cell Mol Med* 2018; n/a-n/a. doi:<https://doi.org/10.1111/jcmm.13369>.
37. Senner CE, Krueger F, Oxley D, Andrews S, Hemberger M. DNA methylation profiles define stem cell identity and reveal a tight embryonic-extraembryonic lineage boundary. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2012;30:2732–45. <https://doi.org/10.1002/stem.1249>.
38. Wilson SL, Robinson WP. Utility of DNA methylation to assess placental health. *Placenta*. 2018;64:523–8. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.12.013>.
39. Sagawa N, Yura S, Itoh H, Mise H, Kakui K, Korita D, et al. Role of leptin in pregnancy—a review. *Placenta*. 2002;23(Suppl A):580–6. <https://doi.org/10.1053/plac.2002.0814>.
40. Howell KR, Powell TL. Effects of maternal obesity on placental function and fetal development. *Reproduction*. 2017;153:R97–108. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0495>.
41. Gallo LA, Barrett HL, Dekker NM. Review: placental transport and metabolism of energy substrates in maternal obesity and diabetes. *Placenta*. n.d. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2016.12.006>.
42. Saben J, Zhong Y, McKelvey S, Dajani NK, Andres A, Badger TM, et al. A comprehensive analysis of the human placenta transcriptome. *Placenta*. 2014;35:125–31. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2013.11.007>.
43. Bouchard L, Thibault S, Guay S-P, Santure M, Monpetit A, St-Pierre J, et al. Leptin gene epigenetic adaptation to impaired glucose metabolism during pregnancy. *Diabetes Care*. 2010;33:2436–41. <https://doi.org/10.2337/dc10-1024>.
44. Marchi M, Lisi S, Curcio M, Barbuti S, Piaggi P, Ceccarini G, et al. Human leptin tissue distribution, but not weight loss-dependent change in expression, is associated with methylation of its promoter. *Epigenetics*. 2011;6:1198–206. <https://doi.org/10.4161/epi.6.10.16600>.
45. Melzner I, Scott V, Dorsch K, Fischer P, Wabitsch M, Brüderlein S, et al. Leptin gene expression in human preadipocytes is switched on by maturation-induced demethylation of distinct CpGs in its proximal promoter. *J Biol Chem*. 2002;277:45420–7. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208511200>.
46. Farley DM, Choi J, Dudley DJ, Li C, Jenkins SL, Myatt L, et al. Placental amino acid transport and placental leptin resistance in pregnancies complicated by maternal obesity. *Placenta*. 2010;31:718–24. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2010.06.006>.
47. Tessier DR, Ferraro ZM, Gruslin A. Role of leptin in pregnancy: consequences of maternal obesity. *Placenta*. 2013;34:205–11. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.11.035>.
48. Good DJ. How tight are your genes? Transcriptional and posttranscriptional regulation of the leptin receptor, NPY, and POMC genes. *Horm Behav*. 2000; 37:284–98. <https://doi.org/10.1006/hbeh.2000.1587>.
49. Cammisotto PG, Bendayan M, Levy E. Regulation of leptin receptor expression in human polarized Caco-2/T15 cells. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2012;12:57–70.
50. Caminos JE, Nogueiras R, Gallego R, Bravo S, Tovar S, García-Caballero T, et al. Expression and regulation of adiponectin and receptor in human and rat placenta. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:4276–86. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0930>.
51. Nelissen ECM, Montfoort V, P.A. A, Dumoulin JCM, Evers JH. Epigenetics and the placenta. *Hum Reprod Update*. 2011;17:397–417. doi:<https://doi.org/10.1093/humupd/dmq052>.
52. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*. 2003;423:762–9. <https://doi.org/10.1038/nature01705>.
53. Husseini A. Expression of adiponectin receptors in human placenta and its possible implication in gestational diabetes. *Am J Biochem Biotechnol*. 2010;6:136–40. <https://doi.org/10.3844/ajbbbsp.2010.136.140>.
54. Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français. *J Gynécologie Obstétrique Biol Reprod* 2005;34:513. doi:[https://doi.org/10.1016/S0368-2315\(05\)82867-4](https://doi.org/10.1016/S0368-2315(05)82867-4).
55. International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Recommendations on the Diagnosis and Classification of Hyperglycemia in Pregnancy. *Diabetes Care* 2010;33:676–682. doi:<https://doi.org/10.2337/dc09-1848>.
56. Kiefer H, Jouneau L, Campion É, Rousseau-Ralliard D, Larcher T, Martin-Magniette M-L, et al. Altered DNA methylation associated with an abnormal liver phenotype in a cattle model with a high incidence of perinatal pathologies. *Sci Rep*. 2016;6:38869. <https://doi.org/10.1038/srep38869>.
57. 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. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.12.018>.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

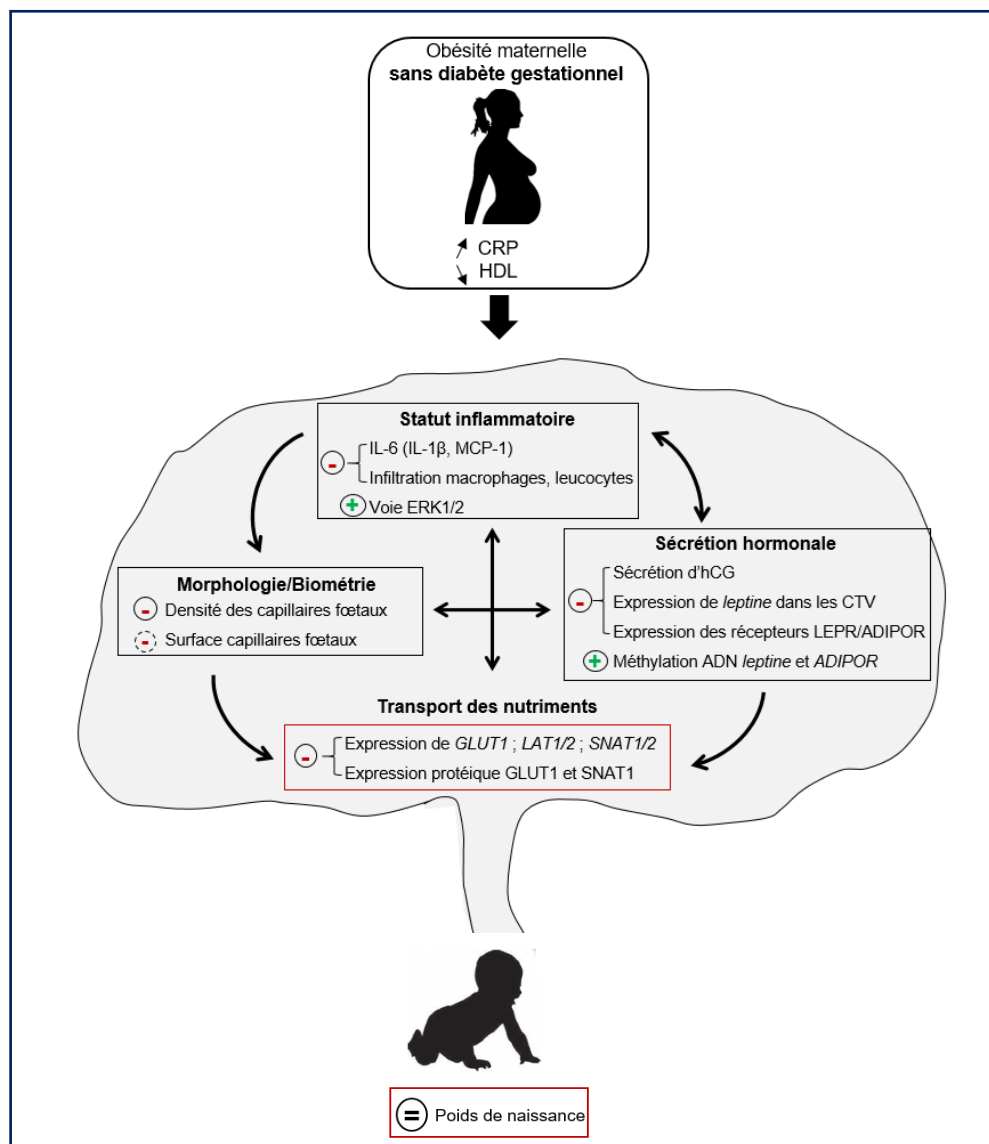
Learn more biomedcentral.com/submissions



Partie 4

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'ensemble de ces travaux a permis de mettre en évidence que, dans l'espèce humaine, **l'obésité maternelle est associée à une diminution du statut inflammatoire du placenta**. De plus, **l'obésité maternelle modifie** les principales fonctions placentaires telles que le contrôle des **échanges fœto-maternels, la réponse immunitaire et la fonction endocrine**. Concernant la fonction endocrine, l'obésité maternelle modifie l'expression de la **leptine**. **Enfin, l'obésité maternelle modifie les marques épigénétiques des systèmes leptine et adiponectine dans le placenta**. Ainsi, le placenta, qui représente une cible de l'obésité maternelle au cours de la grossesse, est **capable de s'adapter** en réponse à cet environnement maternel pathologique (**Figure 45**).



L'obésité maternelle est caractérisée par une inflammation systémique : qu'en est-il du placenta ?

L'obésité maternelle est caractérisée par une inflammation systémique de bas grade, associée à une dyslipidémie et à une insulino-résistance. Plus précisément, l'obésité maternelle est associée à i) une augmentation de marqueurs pro-inflammatoires sériques, tels que la leptine, l'IL-6, le TNF- α , le MCP-1 et la CRP et ii) une diminution de marqueurs anti-inflammatoires tels que l'adiponectine. Dans notre population d'étude, constituée de **femmes obèses sans diabète gestationnel**, nous avons observé une augmentation des taux circulants de CRP et inversement, une diminution des taux de HDL cholestérol, confirmant ainsi les données de la littérature (Aye et al., 2014; Challier et al., 2008; Mitanchez et al., 2017; Pantham et al., 2015; Roberts et al., 2011a). Par conséquent, au cours de la grossesse, le fœtus *via* le placenta est exposé à cet environnement maternel pro-inflammatoire. C'est pourquoi, au cours de ce travail, nous avons étudié les effets potentiels de l'inflammation systémique liée à l'obésité maternelle sur le statut inflammatoire du placenta.

De manière surprenante, dans notre étude, nous avons observé une **diminution de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires**, telles que l'IL-6 et, dans une moindre mesure, le MCP-1 et l'IL-1 β par le placenta entier issu de femmes obèses comparés aux placentas de femmes non-obèses. De plus, nous avons observé un effondrement de l'expression de **l'ARNm de la leptine**, autre cytokine pro-inflammatoire, dans les cellules placentaires isolées à partir de placentas de femmes obèses. Cependant, dans nos populations étudiées, nous n'avons pas observé de différence significative dans la sécrétion de la cytokine anti-inflammatoire IL-10. Nous avons également mis en évidence, pour la première fois, une diminution de la présence des macrophages et des leucocytes dans le placenta de femmes obèses. Ainsi, la **diminution de l'infiltration du tissu placentaire par les macrophages et les leucocytes** observée chez la femme obèse pourrait expliquer, du moins en partie, la nette diminution de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires placentaires dans cette même

population.

Néanmoins, nos résultats diffèrent des données de la littérature. En effet, une étude a clairement démontré une augmentation de l'expression des ARNm des cytokines pro-inflammatoires l'IL-6, l'IL-1, le TNF- α et MCP-1 associée à une infiltration macrophagique massive dans les placentas de femmes obèses (Challier et al., 2008). En revanche, deux autres études révèlent une absence d'impact de l'obésité maternelle sur le recrutement des cellules de l'inflammation dans les placentas de femmes obèses (Loardi et al., 2016; Roberts et al., 2011a). Différentes hypothèses peuvent être émises afin d'expliquer, du moins en partie, ces divergences. Elles sont probablement dues i) aux caractéristiques de la population d'étude qui sont différentes d'une étude à l'autre (différence d'ethnie, choix de l'intervalle d'IMC, présence ou non de diabète gestationnel), ii) à la localisation de l'échantillonnage lui-même (proche ou non du cordon, face foétale, face maternelle) et iii) au nombre d'inclusions de patientes qui varie également beaucoup d'une étude à l'autre (n=10 *versus* n=20).

En résumé, ces premiers résultats suggèrent fortement que le **placenta s'adapte** au statut proinflammatoire systémique maternel **en modulant négativement son propre statut inflammatoire.**

Afin de compléter ces données et sachant que le statut inflammatoire résulte d'une balance entre les cytokines pro- et anti-inflammatoires, nous nous proposons d'étudier la sécrétion des cytokines anti-inflammatoires placentaires telles que l'IL-4, l'IL-13, le TGF- β et l'IL-1Ra dans nos deux populations de femmes obèses et normo-pondérées. Nous souhaitons également étudier l'existence d'une éventuelle boucle d'auto-régulation positive entre la leptine, le TNF- α et l'IL-6 dans le placenta humain. En effet, cette boucle est décrite dans le tissu adipeux et pourrait participer activement aux effets délétères de l'obésité maternelle dans le placenta (Boura-Halfon and Zick, 2009; Rodríguez-Hernández et al., 2013). Pour cela, nous mesurerons les effets *in vitro* de la leptine, du TNF- α et de l'IL-6 sur la sécrétion de chacune de ces cytokines sur un modèle d'explants placentaires. Si une telle régulation est observée dans le placenta, elle pourrait être impliquée dans le maintien du statut hypo-inflammatoire placentaire de la femme obèse (**Figure 46**).

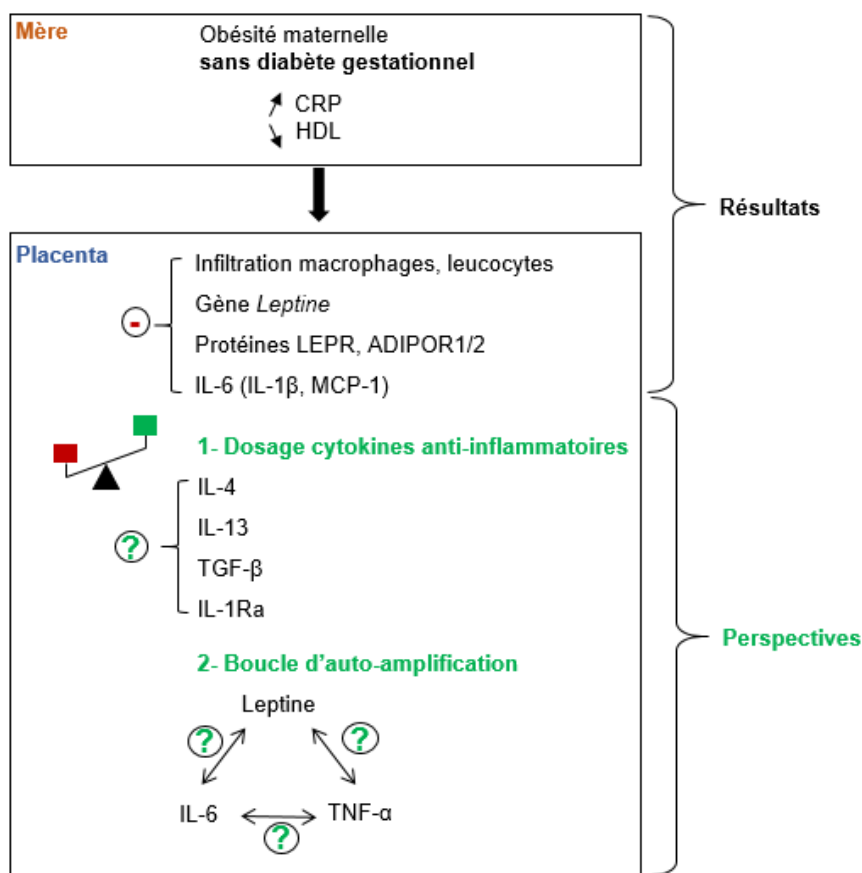


Figure 46 : Bilan et perspectives de l'impact de l'obésité maternelle sur le statut inflammatoire placentaire

Le statut inflammatoire placentaire influence-t-il le transport placentaire des nutriments ?

Au cours de la grossesse, le transport placentaire des nutriments est assuré par le syncytiotrophoblaste qui exprime de nombreux transporteurs membranaires. Les nutriments peuvent être soit utilisés par le placenta pour son propre métabolisme, soit être transférés au fœtus.

Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence **une diminution de l'expression des ARNm des transporteurs** de glucose (GLUT1) et d'acides aminés (LAT1, LAT2, SNAT1 et SNAT2) dans les placentas entiers de femmes obèses. Les expressions protéiques de GLUT1 et SNAT1 sont également diminuées dans ces mêmes placentas. De plus, sur les CTV isolés

à partir de placentas de femmes obèses, nous avons également observés une diminution de l'expression des ARNm des transporteurs LAT1 et SNAT1.

Ces résultats ne sont pas en accord avec les données de la littérature. En effet, trois études récentes ne montrent pas d'effet de l'obésité maternelle sur l'expression placentaire des transporteurs SNATs et LATs (Farley et al., 2010; Gaccioli et al., 2015b; Jansson et al., 2012). Cependant, ces trois études ont mesuré l'expression protéique contrairement à notre étude qui s'est intéressée principalement à l'expression des ARNm de ces transporteurs. En effet, différentes données de la littérature démontrent une absence de corrélation entre les niveaux d'expression des ARNm et des protéines correspondantes (Beileke et al., 2015; Duval, 2017; Salari et al., 2012). De plus, les caractéristiques cliniques de nos deux populations étudiées peuvent de nouveau expliquer ces divergences de résultats.

Parmi les facteurs régulateurs de l'expression des transporteurs placentaires figurent les cytokines. En effet, différentes études menées *in vitro* dans le placenta humain révèlent que l'expression et l'activité de certains de ces transporteurs de nutriments sont clairement régulées par les cytokines pro-inflammatoires. Plus précisément, il a été montré que la leptine, le TNF- α et l'IL-6 stimulent le transport des acides aminés en induisant l'expression de SNAT1 et SNAT2 dans les cytotrophoblastes humains (Aye et al., 2015; Jones et al., 2009; von Versen-Höynck et al., 2009a). De plus, l'activité de SNAT2 dans ces mêmes cellules est stimulée par l'IL-6 et le TNF- α en activant respectivement les voies de signalisation JAK-STAT et p38 MAPK (Aye et al., 2015; Jones et al., 2009).

Ainsi, la diminution de la production des cytokines pro-inflammatoires que nous avons décrites dans le placenta de femmes obèses pourraient expliquer la diminution de l'expression des SNATs.

Afin de compléter ce travail, nous souhaitons étudier l'implication des lipides dans la régulation de l'expression placentaire des transporteurs de nutriments. En effet, il est clairement établi que l'obésité maternelle altère le statut lipidique placentaire. Plus précisément, des études ont montré une augmentation du stockage des TG et des lipides neutres dans le placenta de femmes obèses comparé au placenta de femmes non-obèses (Calabuig-Navarro et al., 2017;

Saben et al., 2014). Par ailleurs, il a été démontré *in vitro* que certains AG modulent de manière différentielle le transport des acides aminés dans les CTV humains. Par exemple, dans les CTV, l'addition d'acide docosahexaénoïque réduit de manière significative l'activité des transporteurs d'acides aminés et inversement l'acide oléique stimule le transport des acides aminés. De plus, l'acide palmitique n'a aucun effet *in vitro* sur l'expression placentaire de ces mêmes transporteurs (Lager et al., 2014).

Dans ce contexte, nous souhaitons déterminer le profil lipidique des placentas de femmes obèses et de femmes non obèses par chromatographie en phase gazeuse. Ce travail sera réalisé en collaboration avec l'UMR 1198 de l'INRA de Jouy-en-Josas. Cette perspective devrait nous permettre de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans les dérégulations des transporteurs de nutriments observés dans le placenta de femmes obèses (**Figure 47**).

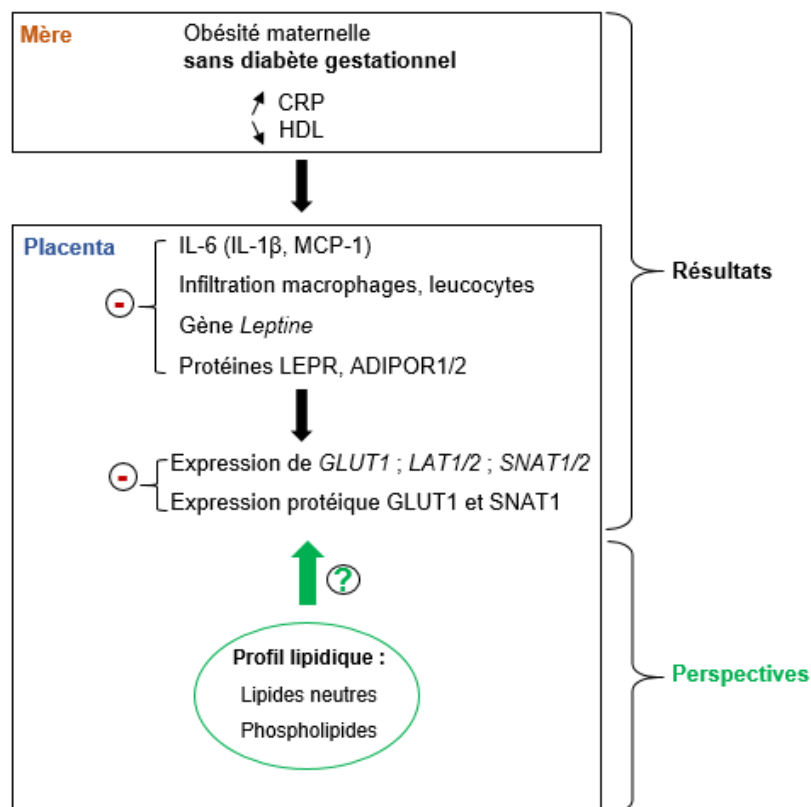


Figure 47 : Bilan et perspectives de l'impact de l'obésité maternelle sur l'expression placentaire des transporteurs de nutriments

Le statut inflammatoire placentaire influence-t-il l'angiogénèse placentaire ?

L'angiogénèse est un processus complexe qui s'opère tout au long du développement placentaire et qui est indispensable aux échanges fœto-maternels.

Dans notre étude, nous n'avons pas observé de différence significative dans le volume et la surface des capillaires fœtaux. En revanche, nous avons observé une diminution du marquage immunohistochimique spécifique des cellules endothéliales dans les placentas de femmes obèses, suggérant une **diminution de la densité des capillaires fœtaux**. De plus, il a été démontré un épaissement de la paroi musculaire des capillaires fœtaux dans les placentas de femmes obèses (Roberts et al., 2011a). Enfin, lors de nos expériences de perfusion placentaire, nous avons constaté une plus grande difficulté à perfuser les placentas de femmes obèses. En effet, le taux d'échec est de 55 % pour les placentas de femmes obèses et de 33 % pour les placentas de femmes non-obèses. Ces résultats peuvent s'expliquer en partie i) par une perméabilité des vaisseaux fœtaux supérieures dans les placentas de femmes obèses par rapport aux femmes contrôles et/ou ii) par une plus grande ramification des vaisseaux fœtaux profonds, diminuant ainsi le débit de circulation, dans les placentas de femmes obèses.

Par ailleurs, des perturbations du développement vasculaire placentaire et des réductions des flux sanguins utérins ont été décrites dans des modèles animaux d'obésité au cours de la gestation. Ainsi, chez des brebis obèses, les placentomes, qui constituent les unités placentaires, présentent une augmentation du diamètre des artérioles en début et à mi-gestation avec une diminution de l'expression de facteurs angiogéniques dans la seconde moitié de la gestation, limitant ainsi le développement vasculaire placentaire (Ma et al., 2010). L'ensemble de ces données, incluant nos travaux, démontrent que l'obésité maternelle perturbe la vascularisation placentaire.

Une nouvelle fois, la diminution de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires placentaires

que nous avons mise en évidence dans ce travail pourrait expliquer la diminution de la densité des capillaires fœtaux dans les placentas de femmes obèses. En effet, la leptine exerce un effet pro-angiogénique dans le placenta humain en augmentant l'expression du facteur clé VEGF et de son récepteur VEGFR2 (Sierra-Honigmann et al., 1998). Nous avons montré que la production de leptine par les CTV est significativement diminuée dans le placenta de femmes obèses. Ainsi, la dérégulation de l'expression de la leptine pourrait participer à la réduction des vaisseaux fœtaux dans les placentas de femmes obèses.

De même, il est bien établi que l'hCG favorise également *in vitro* la production du facteur VEGF par les CTV humains (Berndt et al., 2006; Islami et al., 2003). Or, nous avons montré que la sécrétion d' hCG est, comme la leptine, diminuée dans les CTV issus de placentas de femmes obèses.

En résumé, l'obésité maternelle conduit à **une modification du statut inflammatoire et endocrinien du placenta** qui pourrait être à l'origine d'une **altération de la vascularisation placentaire (Figure 48)**.

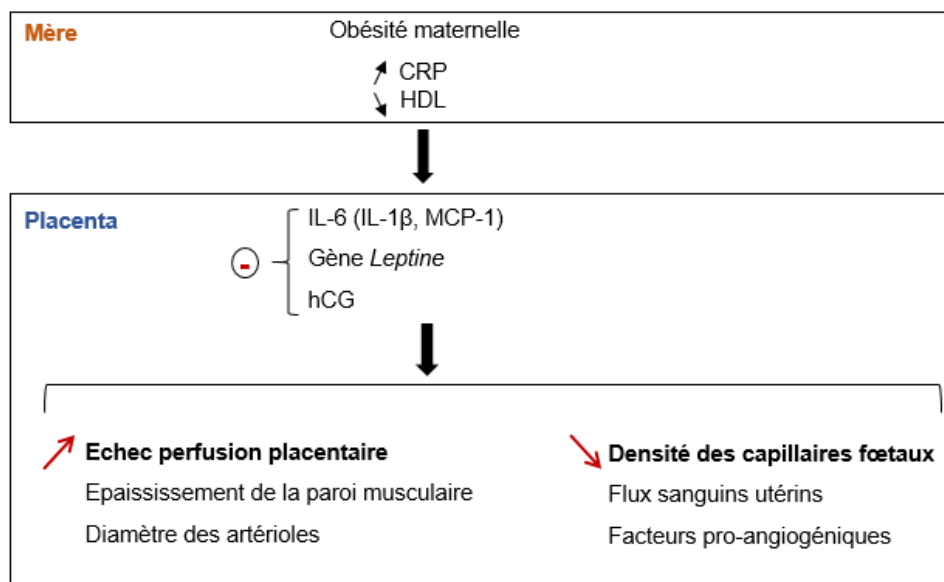


Figure 48 : Bilan de l'impact de l'obésité maternelle sur l'angiogenèse placentaire

Le statut inflammatoire placentaire influence-t-il la différenciation trophoblastique ?

La différenciation trophoblastique s'effectue tout au long de la grossesse. Elle résulte de la fusion des CTV en un syncytium responsable des fonctions endocrine et d'échanges placentaires.

Dans ce travail de thèse, nous avons observé une **diminution de l'expression de l'ARNm de la leptine et de la sécrétion d'hCG** dans les CTV isolés à partir de placentas de femmes obèses. Ces résultats suggèrent que l'obésité maternelle pourrait **diminuer les capacités de différenciation** biochimique des CTV.

Il est bien décrit dans la littérature que la leptine exerce un effet positif sur la production d'hCG et que, en retour, l'hCG stimule la production de leptine par le ST (Cameo et al., 2003; Maymó et al., 2009). Ainsi, dans les placentas de femmes obèses, la diminution combinée de la production de la leptine et de l'hCG pourrait aboutir à une amplification de la réduction des capacités de différenciation des CTV.

Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans cette dérégulation de la différenciation trophoblastique ne sont pas connus. Dans notre laboratoire, nous avons montré que **les mitochondries** semblent contrôler le processus de différenciation des CTV en favorisant la fusion cellulaire et la production hormonale. Cet effet est médié *via* le facteur de transcription *estrogen-related receptor gamma* (ERR γ) qui est décrit comme un acteur clé dans le contrôle de la biogenèse mitochondriale (Poidatz et al., 2012, 2015). De plus, la mitochondrie est la source principale des espèces réactives de l'oxygène (**ROS**) qui sont également décrites comme des régulateurs de la différenciation trophoblastique (Holland et al., 2017; Myatt and Cui, 2004).

Dans les placentas de femmes obèses, des études ont mis en évidence que i) le nombre et la fonction des mitochondries sont altérés et ii) la production des ROS est augmentée en comparaison avec les placentas issues de femmes normo-pondérées.

Nous souhaitons donc étudier la biogenèse et l'activité mitochondriale dans les CTV de placentas de femmes obèses et de femmes normo-pondérées. De plus, nous mesurerons i) l'expression du facteur ERR γ et de ses gènes cibles et ii) le statut oxydatif dans les CTV au cours de leur différenciation *in vitro* en comparant les placentas issus de femmes obèses aux placentas de femmes normo-pondérées. L'ensemble de ce projet devrait permettre de déterminer **l'impact de l'obésité maternelle sur le statut énergétique et oxydatif** en corrélation avec les capacités de **différenciation des cellules trophoblastiques** (Figure 49).

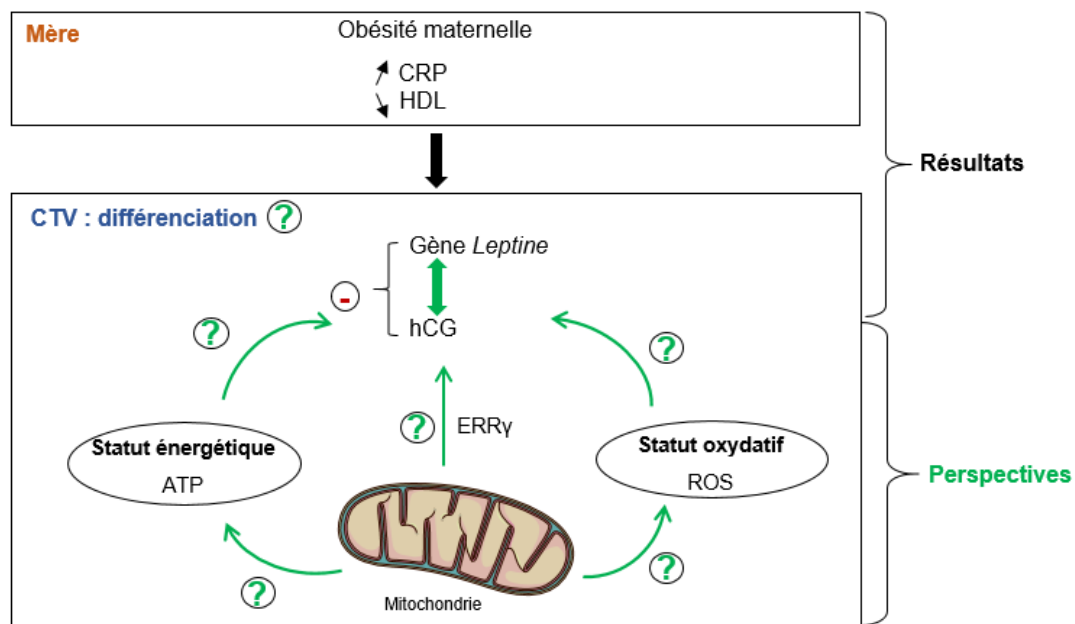


Figure 49 : Bilan et perspectives de l'impact de l'obésité maternelle sur la différenciation trophoblastique

L'inflammation maternelle influence-t-elle la programmation fœtale ?

L'origine développementale de la santé et des maladies (**DOHaD**) est un concept fondé sur l'existence d'une « mémoire » des facteurs de l'environnement pendant les phases précoces du développement fœtal.

Selon ce concept, la grossesse constitue une fenêtre critique d'exposition aux facteurs environnementaux et le placenta un organe potentiel de programmation du phénotype fœtal. Cette programmation est liée à l'apposition de marques épigénétiques telles que la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones et la présence d'ARN non

codants.

L'obésité maternelle intègre ce concept de la DOHaD, en exposant le fœtus à un environnement délétère proinflammatoire, dyslipidémique et pro-oxydant. De nombreuses études montrent que l'obésité maternelle influence la santé de la descendance.

Concernant **le poids de naissance**, les données de la littérature sont controversées. En effet, plusieurs équipes ont observé que l'obésité maternelle entraîne une augmentation du poids de naissance chez l'Homme et dans des modèles animaux (Allbrand et al., 2014; Aye et al., 2014; Challier et al., 2008; Gaccioli et al., 2015b; Zhu et al., 2009). Cependant, dans une étude réalisée chez le lapin, les fœtus mâles et femelles dont les mères étaient nourries avec une alimentation riche en graisses, présentent un retard de croissance intra-utérin et une dyslipidémie. Cette étude met également en évidence un dimorphisme sexuel des effets de l'obésité maternelle avec une prédisposition accrue des fœtus mâles par comparaison aux fœtus femelles (Tarrade et al., 2013). Enfin, plusieurs équipes n'ont démontré aucune corrélation entre le poids fœtal et l'obésité maternelle (Brouwers et al., 2019; Farley et al., 2010; Jansson et al., 2012; Loardi et al., 2016; Mitanchez et al., 2017). Nos résultats sont en accord avec ces derniers travaux. En effet, nous n'avons **pas observé d'effet de l'obésité maternelle sur le poids des nouveau-nés**. Ce résultat pourrait s'expliquer par le choix de la population de femmes étudiée et en particulier par **l'absence de diabète gestationnel**.

Cependant, même si l'obésité maternelle ne semble pas affecter le poids de naissance, elle peut conduire à d'autres altérations. Par exemple, une étude a montré que l'obésité maternelle augmente **l'adiposité** des fœtus filles sans altération du poids fœtal (Mitanchez et al., 2017). Par ailleurs, les études épidémiologiques montrent que les individus nés de mères obèses présentent un risque accru de développer des maladies cardiovasculaires, une hypertension, un **syndrome métabolique** et une obésité à l'âge adulte (Fitzsimons et al., 2009; Leddy et al., 2008; Stubert et al., 2018). Enfin, des études récentes indiquent que l'exposition *in utero* à l'obésité est associée également à des anomalies **comportementales** telles que l'hyperactivité de la descendance (Fernandes et al., 2012). L'impact de l'obésité maternelle sur la descendance pourrait s'expliquer en partie par les marques épigénétiques. En effet, une

étude réalisée chez des primates non humains a montré que l'obésité maternelle induite par l'alimentation entraîne des modifications épigénétiques des gènes hépatiques de la progéniture (Aagaard-Tillery et al., 2008).

Les marques **épigénétiques placentaires** peuvent également participer à la programmation du phénotype fœtal au cours de la grossesse. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la méthylation de l'ADN des gènes de la leptine, de l'adiponectine et de leurs récepteurs spécifiques (LEPR, ADIPOR1/2). Nous avons mis en évidence une **augmentation de la méthylation** des gènes des récepteurs de l'adiponectine (*ADIPOR1/2*) et du gène de la leptine (*LEP*) dans les placentas de femmes obèses. Bien que l'étude soit « gènes-spécifiques », nos résultats sont en accord avec la littérature. En effet, l'équipe de Nomura et ses collaborateurs a mis en évidence que l'obésité maternelle est associée à une augmentation de la méthylation globale de l'ADN dans le placenta de femmes obèses en comparaison avec des femmes non-obèses (Nomura et al., 2014). Une seconde étude plus récente a montré une augmentation de 21 % de la méthylation de l'ADN et une diminution de 31 % de l'hydroxyméthylation de l'ADN dans les placentas exposés à l'obésité maternelle (Mitsuya et al., 2017).

Le placenta se caractérise par un très faible niveau de méthylation globale en situation physiologique. Cependant, il apparaît que dans une situation pathologique telle que l'obésité maternelle, **le placenta répond** à cet environnement délétère en augmentant l'apposition des marques épigénétiques.

L'augmentation de la méthylation observée dans ce travail pourrait s'expliquer par une régulation en amont des enzymes clés impliquées dans la méthylation de l'ADN appelées. DNA méthyltransférases (DNMT). L'expression des DNMT semble contrôlée par différents facteurs tels que i) les cytokines pro-inflammatoires, ii) les ROS et iii) les acides gras dans différents types cellulaires (Lagos et al., 2018; Sarabi and Naghibalhossaini, 2018; Winfield et al., 2016; Wu and Ni, 2015). L'obésité maternelle qui se caractérise par un environnement proinflammatoire, dyslipidémique et pro-oxydant pourrait conduire à une dérégulation des DNMT.

Dans ce contexte, il serait intéressant d'étudier les effets *in vitro* i) des cytokines proinflammatoires ii) des acides gras et iii) des ROS sur l'expression des DNMT dans les placentas humains. Ces travaux devraient permettre de préciser les mécanismes moléculaires impliqués dans les dérégulations épigénétiques du placenta observées au cours de l'obésité maternelle

Conclusion

Nos résultats ont démontré que **l'obésité maternelle altère les fonctions endocrines, d'échanges et immunitaires du placenta**. Néanmoins, nous n'avons pas observés de conséquences néonatales (**poids fœtal identique** à la naissance). Cet organe transitoire semble être un organe **plastique** capable de s'adapter à un environnement maternel délétère afin d'assurer au mieux la croissance et le développement fœtal.

REFERENCES

- Aagaard-Tillery, K.M., Grove, K., Bishop, J., Ke, X., Fu, Q., McKnight, R., and Lane, R.H. (2008). Developmental origins of disease and determinants of chromatin structure: maternal diet modifies the primate fetal epigenome. *J. Mol. Endocrinol.* *41*, 91–102.
- Abd-Alaleem, D.I., Attiaa, K.I., Khalefa, A.A., and Ahmad, R.A. (2011). Adiponectin levels in serum of women with preeclampsia. *East. Mediterr. Health J. Rev. Sante Mediterr. Orient. Al-Majallah Al-Sihhiyah Li-Sharq Al-Mutawassit* *17*, 575–581.
- Acosta, J.R., Tavira, B., Douagi, I., Kulyté, A., Arner, P., Rydén, M., and Laurencikiene, J. (2019). Human-Specific Function of IL-10 in Adipose Tissue Linked to Insulin Resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *104*, 4552–4562.
- Acosta, O., Ramirez, V.I., Lager, S., Gaccioli, F., Dudley, D.J., Powell, T.L., and Jansson, T. (2015). Increased glucose and placental GLUT-1 in large infants of obese nondiabetic mothers. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *212*, 227.e1-227.e7.
- Agarwal, S.K., Vogel, K., Weitsman, S.R., and Magoffin, D.A. (1999). Leptin antagonizes the insulin-like growth factor-I augmentation of steroidogenesis in granulosa and theca cells of the human ovary. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *84*, 1072–1076.
- Agrawal, S., Gollapudi, S., Su, H., and Gupta, S. (2011). Leptin activates human B cells to secrete TNF- α , IL-6, and IL-10 via JAK2/STAT3 and p38MAPK/ERK1/2 signaling pathway. *J. Clin. Immunol.* *31*, 472–478.
- Ahima, R.S., and Flier, J.S. (2000). Leptin. *Annu. Rev. Physiol.* *62*, 413–437.
- Ahima, R.S., Kelly, J., Elmquist, J.K., and Flier, J.S. (1999). Distinct physiologic and neuronal responses to decreased leptin and mild hyperleptinemia. *Endocrinology* *140*, 4923–4931.
- Ajuwon, K.M., and Spurlock, M.E. (2005). Adiponectin inhibits LPS-induced NF-kappaB activation and IL-6 production and increases PPARgamma2 expression in adipocytes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *288*, R1220-1225.
- Alfer, J., Müller-Schöttle, F., Classen-Linke, I., von Rango, U., Happel, L., Beier-Hellwig, K., Rath, W., and Beier, H.M. (2000). The endometrium as a novel target for leptin: differences in fertility and subfertility. *Mol. Hum. Reprod.* *6*, 595–601.
- Allbrand, M., Bjorkqvist, M., Nilsson, K., Ostlund, I., and Aman, J. (2014). Placental gene expression of inflammatory markers and growth factors – a case control study of obese and normal weight women. *J. Perinat. Med.* *43*, 159–164.
- Allison, M.B., and Myers, M.G. (2014). 20 years of leptin: connecting leptin signaling to biological function. *J. Endocrinol.* *223*, T25-35.
- Alsat, E., Guibourdenche, J., Couturier, A., and Evain-Brion, D. (1998). Physiological role of human placental growth hormone. *Mol. Cell. Endocrinol.* *140*, 121–127.
- Amstalden, M., Garcia, M.R., Stanko, R.L., Nizielski, S.E., Morrison, C.D., Keisler, D.H., and Williams, G.L. (2002). Central Infusion of Recombinant Ovine Leptin Normalizes Plasma Insulin and Stimulates a Novel Hypersecretion of Luteinizing Hormone after Short-Term Fasting in Mature Beef Cows. *Biol. Reprod.* *66*, 1555–1561.
- Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G.L., Metzler, K.D., and Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu. Rev. Immunol.* *30*, 459–489.
- Andrews, D.M., Scalzo, A.A., Yokoyama, W.M., Smyth, M.J., and Degli-Esposti, M.A. (2003). Functional interactions between dendritic cells and NK cells during viral infection. *Nat. Immunol.* *4*, 175–181.
- Archanco, M., Muruzábal, F.J., Llopiz, D., Garayoa, M., Gómez-Ambrosi, J., Frühbeck, G., and Burrell, M.A. (2003). Leptin expression in the rat ovary depends on estrous cycle. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* *51*, 1269–1277.
- Asilmaz, E., Cohen, P., Miyazaki, M., Dobrzyn, P., Ueki, K., Fayzikhodjaeva, G., Soukas, A.A., Kahn, C.R., Ntambi, J.M., Succi, N.D., et al. (2004). Site and mechanism of leptin action in a rodent form of congenital lipodystrophy. *J. Clin. Invest.* *113*, 414–424.
- Asseman, C., Mauze, S., Leach, M.W., Coffman, R.L., and Powrie, F. (1999). An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* *190*, 995–1004.
- Aye, I.L.M.H., Powell, T.L., and Jansson, T. (2013). Review: Adiponectin – The Missing Link between Maternal Adiposity, Placental Transport and Fetal Growth? *Placenta* *34 Suppl*, S40–S45.
- Aye, I.L.M.H., Lager, S., Ramirez, V.I., Gaccioli, F., Dudley, D.J., Jansson, T., and Powell, T.L. (2014). Increasing Maternal Body Mass Index Is Associated with Systemic Inflammation in the Mother and the Activation of Distinct Placental Inflammatory Pathways. *Biol. Reprod.* *90*.

- Aye, I.L.M.H., Jansson, T., and Powell, T.L. (2015). TNF- α stimulates System A amino acid transport in primary human trophoblast cells mediated by p38 MAPK signaling. *Physiol. Rep.* 3.
- Ayuk, P.T., Sibley, C.P., Donnai, P., D'Souza, S., and Glazier, J.D. (2000). Development and polarization of cationic amino acid transporters and regulators in the human placenta. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 278, C1162-1171.
- Banerjee, R.R., and Lazar, M.A. (2001). Dimerization of resistin and resistin-like molecules is determined by a single cysteine. *J. Biol. Chem.* 276, 25970–25973.
- Banks, W.A., DiPalma, C.R., and Farrell, C.L. (1999). Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity. *Peptides* 20, 1341–1345.
- Barash, I.A., Cheung, C.C., Weigle, D.S., Ren, H., Kabigting, E.B., Kuijper, J.L., Clifton, D.K., and Steiner, R.A. (1996). Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology* 137, 3144–3147.
- Barnea, G., Strapps, W., Herrada, G., Berman, Y., Ong, J., Kloss, B., Axel, R., and Lee, K.J. (2008). The genetic design of signaling cascades to record receptor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 64–69.
- Barrientos, G., Toro, A., Moschansky, P., Cohen, M., Garcia, M.G., Rose, M., Maskin, B., Sánchez-Margalet, V., Blois, S.M., and Varone, C.L. (2015). Leptin promotes HLA-G expression on placental trophoblasts via the MEK/Erk and PI3K signaling pathways. *Placenta* 36, 419–426.
- Basu, R., Pajvani, U.B., Rizza, R.A., and Scherer, P.E. (2007). Selective downregulation of the high molecular weight form of adiponectin in hyperinsulinemia and in type 2 diabetes: differential regulation from nondiabetic subjects. *Diabetes* 56, 2174–2177.
- Bates, S.H., Stearns, W.H., Dundon, T.A., Schubert, M., Tso, A.W.K., Wang, Y., Banks, A.S., Lavery, H.J., Haq, A.K., Maratos-Flier, E., et al. (2003). STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature* 421, 856–859.
- Baumann, M.U., Schneider, H., Malek, A., Palta, V., Surbek, D.V., Sager, R., Zamudio, S., and Illsley, N.P. (2014). Regulation of Human Trophoblast GLUT1 Glucose Transporter by Insulin-Like Growth Factor I (IGF-I). *PLoS ONE* 9.
- Bays, H. (2014). Central obesity as a clinical marker of adiposopathy; increased visceral adiposity as a surrogate marker for global fat dysfunction. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 21, 345–351.
- Bechi, N., Ietta, F., Romagnoli, R., Focardi, S., Corsi, I., Buffi, C., and Paulesu, L. (2006). Estrogen-like response to p-nonylphenol in human first trimester placenta and BeWo choriocarcinoma cells. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 93, 75–81.
- Beileke, S., Claassen, H., Wagner, W., Matthies, C., Ruf, C., Hartmann, A., Garreis, F., Paulsen, F., Schicht, M., and Bräuer, L. (2015). Expression and Localization of Lung Surfactant Proteins in Human Testis. *PLoS ONE* 10, e0143058.
- Belkaid, Y., Piccirillo, C.A., Mendez, S., Shevach, E.M., and Sacks, D.L. (2002). CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania* major persistence and immunity. *Nature* 420, 502–507.
- Belouzard, S., Delcroix, D., and Rouillé, Y. (2004). Low levels of expression of leptin receptor at the cell surface result from constitutive endocytosis and intracellular retention in the biosynthetic pathway. *J. Biol. Chem.* 279, 28499–28508.
- Benaitreau, D., Dieudonné, M.-N., Santos, E.D., Leneveu, M.-C., Mazancourt, P. de, and Pecquery, R. (2009). Antiproliferative Effects of Adiponectin on Human Trophoblastic Cell Lines JEG-3 and BeWo. *Biol. Reprod.* 80, 1107–1114.
- Benaitreau, D., Santos, E.D., Leneveu, M.-C., De Mazancourt, P., Pecquery, R., and Dieudonné, M.-N. (2010a). Adiponectin promotes syncytialisation of BeWo cell line and primary trophoblast cells. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 8, 128.
- Benaitreau, D., Santos, E.D., Leneveu, M.-C., Alfaidy, N., Feige, J.-J., Mazancourt, P. de, Pecquery, R., and Dieudonné, M.-N. (2010b). Effects of adiponectin on human trophoblast invasion. *J. Endocrinol.* 207, 45–53.
- Benomar, Y., Gertler, A., De Lacy, P., Crépin, D., Ould Hamouda, H., Riffault, L., and Taouis, M. (2013). Central Resistin Overexposure Induces Insulin Resistance Through Toll-Like Receptor 4. *Diabetes* 62, 102–114.
- Berglund, E.D., Vianna, C.R., Donato, J., Kim, M.H., Chuang, J.-C., Lee, C.E., Lauzon, D.A., Lin, P., Brule, L.J., Scott, M.M., et al. (2012). Direct leptin action on POMC neurons regulates glucose homeostasis and hepatic insulin sensitivity in mice. *J. Clin. Invest.* 122, 1000–1009.
- Berndt, J., Klötting, N., Kralisch, S., Kovacs, P., Fasshauer, M., Schön, M.R., Stumvoll, M., and Blüher, M. (2005). Plasma visfatin concentrations and fat depot-specific mRNA expression in humans. *Diabetes* 54, 2911–2916.

- Berndt, S., Perrier d'Hauterive, S., Blacher, S., Péqueux, C., Lorquet, S., Munaut, C., Applanat, M., Hervé, M.A., Lamandé, N., Corvol, P., et al. (2006). Angiogenic activity of human chorionic gonadotropin through LH receptor activation on endothelial and epithelial cells of the endometrium. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *20*, 2630–2632.
- Berrington de Gonzalez, A., Hartge, P., Cerhan, J.R., Flint, A.J., Hannan, L., MacInnis, R.J., Moore, S.C., Tobias, G.S., Anton-Culver, H., Freeman, L.B., et al. (2010). Body-mass index and mortality among 1.46 million white adults. *N. Engl. J. Med.* *363*, 2211–2219.
- Bertola, A., Ciucci, T., Rousseau, D., Bourlier, V., Duffaut, C., Bonnafous, S., Blin-Wakkach, C., Anty, R., Iannelli, A., Gugenheim, J., et al. (2012). Identification of adipose tissue dendritic cells correlated with obesity-associated insulin-resistance and inducing Th17 responses in mice and patients. *Diabetes* *61*, 2238–2247.
- Bi, T., and Che, X. (2010). Namp1/PBEF/visfatin and cancer. *Cancer Biol. Ther.* *10*, 119–125.
- Bibee, K.P., Illsley, N.P., and Moley, K.H. (2011). Asymmetric syncytial expression of GLUT9 splice variants in human term placenta and alterations in diabetic pregnancies. *Reprod. Sci. Thousand Oaks Calif* *18*, 20–27.
- Bibert, S., Hess, S.K., Firsov, D., Thorens, B., Geering, K., Horisberger, J.-D., and Bonny, O. (2009). Mouse GLUT9: evidences for a urate uniporter. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* *297*, F612-619.
- Biron-Shental, T., Schaiff, W.T., Ratajczak, C.K., Bildirici, I., Nelson, D.M., and Sadovsky, Y. (2007). Hypoxia regulates the expression of fatty acid-binding proteins in primary term human trophoblasts. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *197*, 516.e1-6.
- Bischof, P., and Campana, A. (2000). Molecular mediators of implantation. *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* *14*, 801–814.
- Bischof, P., Martelli, M., Campana, A., Itoh, Y., Ogata, Y., and Nagase, H. (1995). Importance of matrix metalloproteinases in human trophoblast invasion. *Early Pregnancy Biol. Med. Off. J. Soc. Investig. Early Pregnancy* *1*, 263–269.
- Bjørbaek, C., Uotani, S., Silva, B. da, and Flier, J.S. (1997). Divergent Signaling Capacities of the Long and Short Isoforms of the Leptin Receptor. *J. Biol. Chem.* *272*, 32686–32695.
- Bjørbaek, C., Elmquist, J.K., Frantz, J.D., Shoelson, S.E., and Flier, J.S. (1998). Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol. Cell* *1*, 619–625.
- Bjørbaek, C., El-Haschimi, K., Frantz, J.D., and Flier, J.S. (1999). The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. *J. Biol. Chem.* *274*, 30059–30065.
- Bjørbaek, C., Buchholz, R.M., Davis, S.M., Bates, S.H., Pierroz, D.D., Gu, H., Neel, B.G., Myers, M.G., and Flier, J.S. (2001). Divergent Roles of SHP-2 in ERK Activation by Leptin Receptors. *J. Biol. Chem.* *276*, 4747–4755.
- Björklund, A.O., Adamson, U.K., Carlström, K.A., Hennen, G., Igout, A., Lins, P.E., and Westgren, L.M. (1998). Placental hormones during induced hypoglycaemia in pregnant women with insulin-dependent diabetes mellitus: evidence of an active role for placenta in hormonal counter-regulation. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* *105*, 649–655.
- Björnholm, M., Münzberg, H., Leshan, R.L., Villanueva, E.C., Bates, S.H., Louis, G.W., Jones, J.C., Ishida-Takahashi, R., Bjørbaek, C., and Myers, M.G. (2007). Mice lacking inhibitory leptin receptor signals are lean with normal endocrine function. *J. Clin. Invest.* *117*, 1354–1360.
- Björnström, L., and Sjöberg, M. (2005). Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *19*, 833–842.
- Black, S., Kadyrov, M., Kaufmann, P., Ugele, B., Emans, N., and Huppertz, B. (2004). Syncytial fusion of human trophoblast depends on caspase 8. *Cell Death Differ.* *11*, 90–98.
- Blond, J.L., Lavillette, D., Cheynet, V., Bouton, O., Oriol, G., Chapel-Fernandes, S., Mandrand, B., Mallet, F., and Cosset, F.L. (2000). An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor. *J. Virol.* *74*, 3321–3329.
- Bloxam, D.L., Bax, B.E., and Bax, C.M. (1994). Epidermal growth factor and insulin-like growth factor I differently influence the directional accumulation and transfer of 2-aminoisobutyrate (AIB) by human placental trophoblast in two-sided culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *199*, 922–929.
- Boden, G., Chen, X., Kolaczynski, J.W., and Polansky, M. (1997). Effects of prolonged hyperinsulinemia on serum leptin in normal human subjects. *J. Clin. Invest.* *100*, 1107–1113.
- Bonduelle, M.L., Dodd, R., Liebaers, I., Van Steirteghem, A., Williamson, R., and Akhurst, R. (1988). Chorionic gonadotrophin-beta mRNA, a trophoblast marker, is expressed in human 8-cell embryos derived from tripronucleate zygotes. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *3*, 909–914.

- Boucher, J., Masri, B., Daviaud, D., Gesta, S., Guigné, C., Mazzucotelli, A., Castan-Laurell, I., Tack, I., Knibiehler, B., Carpené, C., et al. (2005). Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology* *146*, 1764–1771.
- Bouloumie, A., Marumo, T., Lafontan, M., and Busse, R. (1999). Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *13*, 1231–1238.
- Boura-Halfon, S., and Zick, Y. (2009). Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *296*, E581–591.
- Bozaoglu, K., Bolton, K., McMillan, J., Zimmet, P., Jowett, J., Collier, G., Walder, K., and Segal, D. (2007). Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome. *Endocrinology* *148*, 4687–4694.
- Bråkenhielm, E., Veitonmäki, N., Cao, R., Kihara, S., Matsuzawa, Y., Zhivotovsky, B., Funahashi, T., and Cao, Y. (2004). Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 2476–2481.
- Brannian, J.D., Zhao, Y., and McElroy, M. (1999). Leptin inhibits gonadotrophin-stimulated granulosa cell progesterone production by antagonizing insulin action. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *14*, 1445–1448.
- Brar, A.K., Frank, G.R., Kessler, C.A., Cedars, M.I., and Handwerger, S. (1997). Progesterone-dependent decidualization of the human endometrium is mediated by cAMP. *Endocrine* *6*, 301–307.
- Braud, V.M., Allan, D.S., and McMichael, A.J. (1999). Functions of nonclassical MHC and non-MHC-encoded class I molecules. *Curr. Opin. Immunol.* *11*, 100–108.
- Brelje, T.C., Scharp, D.W., Lacy, P.E., Ogren, L., Talamantes, F., Robertson, M., Friesen, H.G., and Sorenson, R.L. (1993). Effect of homologous placental lactogens, prolactins, and growth hormones on islet B-cell division and insulin secretion in rat, mouse, and human islets: implication for placental lactogen regulation of islet function during pregnancy. *Endocrinology* *132*, 879–887.
- Broeder, J.A., Smith, C.H., and Moe, A.J. (1994). Glutamate oxidation by trophoblasts in vitro. *Am. J. Physiol.* *267*, C189–194.
- Bröer, S. (2002). Adaptation of plasma membrane amino acid transport mechanisms to physiological demands. *Pflügers Arch.* *444*, 457–466.
- Broughton, D.E., and Moley, K.H. (2017). Obesity and female infertility: potential mediators of obesity's impact. *Fertil. Steril.* *107*, 840–847.
- Brouwers, L., Franx, A., Vogelvang, T.E., Houben, M.L., van Rijn, B.B., and Nikkels, P.G. (2019). Association of Maternal Prepregnancy Body Mass Index With Placental Histopathological Characteristics in Uncomplicated Term Pregnancies. *Pediatr. Dev. Pathol.* *22*, 45–52.
- Brownbill, P., Edwards, D., Jones, C., Mahendran, D., Owen, D., Sibley, C., Johnson, R., Swanson, P., and Nelson, D.M. (1995). Mechanisms of alphafetoprotein transfer in the perfused human placental cotyledon from uncomplicated pregnancy. *J. Clin. Invest.* *96*, 2220–2226.
- Bruno, A., Conus, S., Schmid, I., and Simon, H.-U. (2005). Apoptotic pathways are inhibited by leptin receptor activation in neutrophils. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 8090–8096.
- Buettner, C., Muse, E.D., Cheng, A., Chen, L., Scherer, T., Poci, A., Su, K., Cheng, B., Li, X., Harvey-White, J., et al. (2008). Leptin controls adipose tissue lipogenesis via central, STAT3-independent mechanisms. *Nat. Med.* *14*, 667–675.
- Bukovsky, A., Cekanova, M., Caudle, M.R., Wimalasena, J., Foster, J.S., Henley, D.C., and Elder, R.F. (2003). Expression and localization of estrogen receptor-alpha protein in normal and abnormal term placentae and stimulation of trophoblast differentiation by estradiol. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* *1*, 13.
- Bulmer, J.N. (1992). Immune aspects of pathology of the placental bed contributing to pregnancy pathology. *Baillieres Clin. Obstet. Gynaecol.* *6*, 461–488.
- Bulmer, J.N., Williams, P.J., and Lash, G.E. (2010). Immune cells in the placental bed. *Int. J. Dev. Biol.* *54*, 281–294.
- Burger, O., Pick, E., Zwickel, J., Klayman, M., Meiri, H., Slotky, R., Mandel, S., Rabinovitch, L., Paltieli, Y., Admon, A., et al. (2004). Placental protein 13 (PP-13): effects on cultured trophoblasts, and its detection in human body fluids in normal and pathological pregnancies. *Placenta* *25*, 608–622.
- Burton, G.J., Jauniaux, E., and Charnock-Jones, D.S. (2007). Human early placental development: potential roles of the endometrial glands. *Placenta* *28 Suppl A*, S64–69.

- Calabuig-Navarro, V., Haghiac, M., Minium, J., Glazebrook, P., Ranasinghe, G.C., Hoppel, C., Hauguel de-Mouzon, S., Catalano, P., and O'Tierney-Ginn, P. (2017). Effect of maternal obesity on placental lipid metabolism. *Endocrinology*.
- Caldefie-Chezet, F., Poulin, A., Tridon, A., Sion, B., and Vasson, M.P. (2001). Leptin: a potential regulator of polymorphonuclear neutrophil bactericidal action? *J. Leukoc. Biol.* 69, 414–418.
- Camelo, J.S., Jorge, S.M., and Martinez, F.E. (2004). Amino acid composition of parturient plasma, the intervillous space of the placenta and the umbilical vein of term newborn infants. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Medicas E Biol.* 37, 711–717.
- Cameo, P., Bischof, P., and Calvo, J.C. (2003). Effect of leptin on progesterone, human chorionic gonadotropin, and interleukin-6 secretion by human term trophoblast cells in culture. *Biol. Reprod.* 68, 472–477.
- Campbell, F.M., and Dutta-Roy, A.K. (1995). Plasma membrane fatty acid-binding protein (FABPpm) is exclusively located in the maternal facing membranes of the human placenta. *FEBS Lett.* 375, 227–230.
- Campbell, F.M., Taffesse, S., Gordon, M.J., and Duttaroy, A.K. (1995). Plasma Membrane Fatty-Acid-Binding Protein in Human Placenta: Identification and Characterization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209, 1011–1017.
- Campbell, F.M., Clohessy, A.M., Gordon, M.J., Page, K.R., and Dutta-Roy, A.K. (1997). Uptake of long chain fatty acids by human placental choriocarcinoma (BeWo) cells: role of plasma membrane fatty acid-binding protein. *J. Lipid Res.* 38, 2558–2568.
- Campbell, F.M., Gordon, M.J., and Dutta-Roy, A.K. (1998). Placental membrane fatty acid-binding protein preferentially binds arachidonic and docosahexaenoic acids. *Life Sci.* 63, 235–240.
- Campfield, L.A., Smith, F.J., Guisez, Y., Devos, R., and Burn, P. (1995). Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269, 546–549.
- Carino, C., Olawaiye, A.B., Cherfils, S., Serikawa, T., Lynch, M.P., Rueda, B.R., and Gonzalez, R.R. (2008). Leptin regulation of proangiogenic molecules in benign and cancerous endometrial cells. *Int. J. Cancer* 123, 2782–2790.
- Carlile, G.W., Smith, D.H., and Wiedmann, M. (2004). Caspase-3 has a nonapoptotic function in erythroid maturation. *Blood* 103, 4310–4316.
- Carlino, C., Trotta, E., Stabile, H., Morrone, S., Bulla, R., Soriani, A., Iannitto, M.L., Agostinis, C., Mocci, C., Minozzi, M., et al. (2012). Chemerin regulates NK cell accumulation and endothelial cell morphogenesis in the decidua during early pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, 3603–3612.
- Carrell, D.T., Jones, K.P., Peterson, C.M., Aoki, V., Emery, B.R., and Campbell, B.R. (2001). Body mass index is inversely related to intra-follicular HCG concentrations, embryo quality and IVF outcome. *Reprod. Biomed. Online* 3, 109–111.
- Cartwright, J.E., Fraser, R., Leslie, K., Wallace, A.E., and James, J.L. (2010). Remodelling at the maternal-fetal interface: relevance to human pregnancy disorders. *Reprod. Camb. Engl.* 140, 803–813.
- Castellano, J.M., Bentsen, A.H., Mikkelsen, J.D., and Tena-Sempere, M. (2010). Kisspeptins: bridging energy homeostasis and reproduction. *Brain Res.* 1364, 129–138.
- Castellucci, M., De Matteis, R., Meisser, A., Canello, R., Monsurrò, V., Islami, D., Sarzani, R., Marzioni, D., Cinti, S., and Bischof, P. (2000). Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases: possible implications for trophoblast invasion. *Mol. Hum. Reprod.* 6, 951–958.
- Caufriez, A., Frankenke, F., Hennen, G., and Copinschi, G. (1993). Regulation of maternal IGF-I by placental GH in normal and abnormal human pregnancies. *Am. J. Physiol.* 265, E572-577.
- Ceddia, R.B., Somwar, R., Maida, A., Fang, X., Bikopoulos, G., and Sweeney, G. (2005). Globular adiponectin increases GLUT4 translocation and glucose uptake but reduces glycogen synthesis in rat skeletal muscle cells. *Diabetologia* 48, 132–139.
- Cetin, I., Marconi, A.M., Bozzetti, P., Sereni, L.P., Corbetta, C., Pardi, G., and Battaglia, F.C. (1988). Umbilical amino acid concentrations in appropriate and small for gestational age infants: a biochemical difference present in utero. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 158, 120–126.
- Cetin, I., de Santis, M.S.N., Taricco, E., Radaelli, T., Teng, C., Ronzoni, S., Spada, E., Milani, S., and Pardi, G. (2005). Maternal and fetal amino acid concentrations in normal pregnancies and in pregnancies with gestational diabetes mellitus. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 192, 610–617.
- Chabrolle, C., Tosca, L., Ramé, C., Lecomte, P., Royère, D., and Dupont, J. (2009). Adiponectin increases insulin-like growth factor I-induced progesterone and estradiol secretion in human granulosa cells. *Fertil. Steril.* 92, 1988–1996.

- Challier, J., Galtier, M., Bintein, T., Cortez, A., Lepercq, J., and Hauguel-de Mouzon, S. (2003). Placental leptin receptor isoforms in normal and pathological pregnancies. *Placenta* 24, 92–99.
- Challier, J., Basu, S., Bintein, T., Hotmire, K., Minium, J., Catalano, P., and Hauguel-de Mouzon, S. (2008). Obesity in pregnancy stimulates macrophage accumulation and inflammation in the placenta. *Placenta* 29, 274–281.
- Chang, E., Choi, J.M., Kim, W.J., Rhee, E.-J., Oh, K.W., Lee, W.-Y., Park, S.E., Park, S.W., and Park, C.-Y. (2014). Restoration of adiponectin expression via the ERK pathway in TNF α -treated 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Med. Rep.* 10, 905–910.
- Chaouat, G., Mas, A.-E., Petitbarat, M., Dubanchet, S., and Ledée, N. (2007). [Physiology of implantation]. *Gynecol. Obstet. Fertil.* 35, 861–866.
- Chappaz, E., Albornoz, M.S., Campos, D., Che, L., Palin, M.-F., Murphy, B.D., and Bordignon, V. (2008). Adiponectin enhances in vitro development of swine embryos. *Domest. Anim. Endocrinol.* 35, 198–207.
- Charnock-Jones, D.S., Kaufmann, P., and Mayhew, T.M. (2004). Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. *Placenta* 25, 103–113.
- Chehab, F.F., Lim, M.E., and Lu, R. (1996). Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat. Genet.* 12, 318.
- Chen, G.-Y., Tang, J., Zheng, P., and Liu, Y. (2009). CD24 and Siglec-10 selectively repress tissue damage-induced immune responses. *Science* 323, 1722–1725.
- Chen, H., Chen, H., Wu, Y., Liu, B., Li, Z., and Wang, Z. (2014). Adiponectin exerts antiproliferative effect on human placenta via modulation of the JNK/c-Jun pathway. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 7, 2894–2904.
- Chen, J.Z.-J., Wong, M.H., Brennecke, S.P., and Keogh, R.J. (2011). The effects of human chorionic gonadotrophin, progesterone and oestradiol on trophoblast function. *Mol. Cell. Endocrinol.* 342, 73–80.
- Cheng, L., Shi, H., Jin, Y., Li, X., Pan, J., Lai, Y., Lin, Y., Jin, Y., Roy, G., Zhao, A., et al. (2016). Adiponectin Deficiency Leads to Female Subfertility and Ovarian Dysfunctions in Mice. *Endocrinology* 157, 4875–4887.
- Cheng, X.-B., Wen, J.-P., Yang, J., Yang, Y., Ning, G., and Li, X.-Y. (2011). GnRH secretion is inhibited by adiponectin through activation of AMP-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase. *Endocrine* 39, 6–12.
- Choi, J., and Smits, J. (2014). Luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin: distinguishing unique physiologic roles. *Gynecol. Endocrinol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Endocrinol.* 30, 174–181.
- Choquet, H., and Meyre, D. (2011). Genetics of Obesity: What have we Learned? *Curr. Genomics* 12, 169–179.
- Church, L.D., Cook, G.P., and McDermott, M.F. (2008). Primer: inflammasomes and interleukin 1beta in inflammatory disorders. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 4, 34–42.
- Cildir, G., Akıncılar, S.C., and Tergaonkar, V. (2013). Chronic adipose tissue inflammation: all immune cells on the stage. *Trends Mol. Med.* 19, 487–500.
- Cinti, S., Matteis, R.D., Picó, C., Ceresi, E., Obrador, A., Maffei, C., Oliver, J., and Palou, A. (2000). Secretory granules of endocrine and chief cells of human stomach mucosa contain leptin. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* 24, 789–793.
- Cirillo, D., Rachiglio, A.M., la Montagna, R., Giordano, A., and Normanno, N. (2008). Leptin signaling in breast cancer: an overview. *J. Cell. Biochem.* 105, 956–964.
- Clarson, L.H., Glazier, J.D., Sides, M.K., and Sibley, C.P. (1997). Expression of the facilitated glucose transporters (GLUT1 and GLUT3) by a choriocarcinoma cell line (JAR) and cytotrophoblast cells in culture. *Placenta* 18, 333–339.
- Cleal, J.K., and Lewis, R.M. (2008). The Mechanisms and Regulation of Placental Amino Acid Transport to the Human Foetus. *J. Neuroendocrinol.* 20, 419–426.
- Cleal, J.K., Glazier, J.D., Ntani, G., Crozier, S.R., Day, P.E., Harvey, N.C., Robinson, S.M., Cooper, C., Godfrey, K.M., Hanson, M.A., et al. (2011). Facilitated transporters mediate net efflux of amino acids to the fetus across the basal membrane of the placental syncytiotrophoblast. *J. Physiol.* 589, 987–997.
- Cohen, S.L., Halaas, J.L., Friedman, J.M., Chait, B.T., Bennett, L., Chang, D., Hecht, R., and Collins, F. (1996). Human leptin characterization. *Nature* 382, 589.
- Coll, A.P., Farooqi, I.S., and O'Rahilly, S. (2007). The Hormonal Control of Food Intake. *Cell* 129, 251–262.

- Combs, T.P., and Marlist, E.B. (2014). Adiponectin signaling in the liver. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* *15*, 137–147.
- Combs, T.P., Berg, A.H., Obici, S., Scherer, P.E., and Rossetti, L. (2001). Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J. Clin. Invest.* *108*, 1875–1881.
- Combs, T.P., Pajvani, U.B., Berg, A.H., Lin, Y., Jelicks, L.A., Laplante, M., Nawrocki, A.R., Rajala, M.W., Parlow, A.F., Cheeseboro, L., et al. (2004). A Transgenic Mouse with a Deletion in the Collagenous Domain of Adiponectin Displays Elevated Circulating Adiponectin and Improved Insulin Sensitivity. *Endocrinology* *145*, 367–383.
- Constância, M., Angiolini, E., Sandovici, I., Smith, P., Smith, R., Kelsey, G., Dean, W., Ferguson-Smith, A., Sibley, C.P., Reik, W., et al. (2005). Adaptation of nutrient supply to fetal demand in the mouse involves interaction between the *Igf2* gene and placental transporter systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 19219–19224.
- Coppari, R., Ichinose, M., Lee, C.E., Pullen, A.E., Kenny, C.D., McGovern, R.A., Tang, V., Liu, S.M., Ludwig, T., Chua, S.C., et al. (2005). The hypothalamic arcuate nucleus: A key site for mediating leptin's effects on glucose homeostasis and locomotor activity. *Cell Metab.* *1*, 63–72.
- Costa, M.A. (2016). The endocrine function of human placenta: an overview. *Reprod. Biomed. Online* *32*, 14–43.
- Couillard, C., Mauriège, P., Imbeault, P., Prud'homme, D., Nadeau, A., Tremblay, A., Bouchard, C., and Després, J.P. (2000). Hyperleptinemia is more closely associated with adipose cell hypertrophy than with adipose tissue hyperplasia. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* *24*, 782–788.
- Cowley, M.A., Smart, J.L., Rubinstein, M., Cerdán, M.G., Diano, S., Horvath, T.L., Cone, R.D., and Low, M.J. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* *411*, 480–484.
- Coya, R., Martul, P., Algorta, J., Aniel-Quiroga, M.A., Busturia, M.A., and Señarís, R. (2005). Progesterone and human placental lactogen inhibit leptin secretion on cultured trophoblast cells from human placentas at term. *Gynecol. Endocrinol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Endocrinol.* *21*, 27–32.
- Coya, R., Martul, P., Algorta, J., Aniel-Quiroga, M.A., Busturia, M.A., and Señarís, R. (2006). Effect of leptin on the regulation of placental hormone secretion in cultured human placental cells. *Gynecol. Endocrinol.* *22*, 620–626.
- Crewe, C., An, Y.A., and Scherer, P.E. (2017). The ominous triad of adipose tissue dysfunction: inflammation, fibrosis, and impaired angiogenesis. *J. Clin. Invest.* *127*, 74–82.
- Csapo, A.I., Knobil, E., van der Molen, H.J., and Wiest, W.G. (1971). Peripheral plasma progesterone levels during human pregnancy and labor. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *110*, 630–632.
- Cummins, J.M. (2004). The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* *115 Suppl 1*, S23-29.
- Cunningham, P., and McDermott, L. (2009). Long chain PUFA transport in human term placenta. *J. Nutr.* *139*, 636–639.
- Curat, C.A., Miranville, A., Sengenès, C., Diehl, M., Tonus, C., Busse, R., and Bouloumié, A. (2004). From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes* *53*, 1285–1292.
- Dagenais, M., Dupaul-Chicoine, J., and Saleh, M. (2010). Function of NOD-like receptors in immunity and disease. *Curr. Opin. Investig. Drugs Lond. Engl.* *2000 11*, 1246–1255.
- Dalamaga, M., Srinivas, S.K., Elovitz, M.A., Chamberland, J., and Mantzoros, C.S. (2011). Serum adiponectin and leptin in relation to risk for preeclampsia: results from a large case-control study. *Metabolism.* *60*, 1539–1544.
- Daniele, A., Cammarata, R., Pasanisi, F., Finelli, C., Salvatori, G., Calcagno, G., Bracale, R., Labruna, G., Nardelli, C., Buono, P., et al. (2008). Molecular analysis of the adiponectin gene in severely obese patients from southern Italy. *Ann. Nutr. Metab.* *53*, 155–161.
- Daoud, G., Simoneau, L., Masse, A., Rassart, E., and Lafond, J. (2005). Expression of cFABP and PPAR in trophoblast cells: effect of PPAR ligands on linoleic acid uptake and differentiation. *Biochim. Biophys. Acta* *1687*, 181–194.
- Daoud, G., Rassart, E., Masse, A., and Lafond, J. (2006). Src family kinases play multiple roles in differentiation of trophoblasts from human term placenta. *J. Physiol.* *571*, 537–553.
- De Rosa, A., Monaco, M.L., Capasso, M., Forestieri, P., Pitone, V., Nardelli, C., Buono, P., and Daniele, A. (2013). Adiponectin oligomers as potential indicators of adipose tissue improvement in obese subjects. *Eur. J. Endocrinol.* *169*, 37–43.
- DeFuria, J., Belkina, A.C., Jagannathan-Bogdan, M., Snyder-Cappione, J., Carr, J.D., Nersesova, Y.R., Markham, D., Strissel, K.J., Watkins, A.A., Zhu, M., et al. (2013). B cells promote inflammation in obesity and type 2 diabetes through regulation of T-cell function and an inflammatory cytokine profile. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 5133–5138.

- Degawa-Yamauchi, M., Bovenkerk, J.E., Juliar, B.E., Watson, W., Kerr, K., Jones, R., Zhu, Q., and Considine, R.V. (2003). Serum resistin (FIZZ3) protein is increased in obese humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *88*, 5452–5455.
- Delporte, M.L., Brichard, S.M., Hermans, M.P., Beguin, C., and Lambert, M. (2003). Hyperadiponectinaemia in anorexia nervosa. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* *58*, 22–29.
- Denecker, G., Ovaere, P., Vandenabeele, P., and Declercq, W. (2008). Caspase-14 reveals its secrets. *J. Cell Biol.* *180*, 451–458.
- Denison, F.C., Roberts, K.A., Barr, S.M., and Norman, J.E. (2010). Obesity, pregnancy, inflammation, and vascular function. *Reproduction* *140*, 373–385.
- Desforgues, M., Mynett, K.J., Jones, R.L., Greenwood, S.L., Westwood, M., Sibley, C.P., and Glazier, J.D. (2009). The SNAT4 isoform of the system A amino acid transporter is functional in human placental microvillous plasma membrane. *J. Physiol.* *587*, 61–72.
- Desforgues, M., Greenwood, S.L., Glazier, J.D., Westwood, M., and Sibley, C.P. (2010). The contribution of SNAT1 to system A amino acid transporter activity in human placental trophoblast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *398*, 130–134.
- Dessolle, L., Daraï, E., Cornet, D., Rouzier, R., Coutant, C., Mandelbaum, J., and Antoine, J.-M. (2009). Determinants of pregnancy rate in the donor oocyte model: a multivariate analysis of 450 frozen-thawed embryo transfers. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *24*, 3082–3089.
- Di Simone, N., Di Nicuolo, F., Sanguinetti, M., Castellani, R., D'Asta, M., Caforio, L., and Caruso, A. (2006). Resistin regulates human choriocarcinoma cell invasive behaviour and endothelial cell angiogenic processes. *J. Endocrinol.* *189*, 691–699.
- Dieudonne, M.-N., Bussiere, M., Dos Santos, E., Leneveu, M.-C., Giudicelli, Y., and Pecquery, R. (2006). Adiponectin mediates antiproliferative and apoptotic responses in human MCF7 breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *345*, 271–279.
- Dos Santos, E., Serazin, V., Morvan, C., Torre, A., Wainer, R., de Mazancourt, P., and Dieudonné, M.-N. (2012). Adiponectin and leptin systems in human endometrium during window of implantation. *Fertil. Steril.* *97*, 771-778.e1.
- Dressing, G.E., Goldberg, J.E., Charles, N.J., Schwertfeger, K.L., and Lange, C.A. (2011). Membrane progesterone receptor expression in mammalian tissues; a review of regulation and physiological implications. *Steroids* *76*, 11–17.
- Dubé, E., Gravel, A., Martin, C., Desparois, G., Moussa, I., Ethier-Chiasson, M., Forest, J.-C., Giguère, Y., Masse, A., and Lafond, J. (2012). Modulation of Fatty Acid Transport and Metabolism by Maternal Obesity in the Human Full-Term Placenta. *Biol. Reprod.* *87*.
- Duffaut, C., Galitzky, J., Lafontan, M., and Bouloumié, A. (2009). Unexpected trafficking of immune cells within the adipose tissue during the onset of obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *384*, 482–485.
- Duggal, P.S., Van Der Hoek, K.H., Milner, C.R., Ryan, N.K., Armstrong, D.T., Magoffin, D.A., and Norman, R.J. (2000). The in vivo and in vitro effects of exogenous leptin on ovulation in the rat. *Endocrinology* *141*, 1971–1976.
- Dumollard, R., Ward, Z., Carroll, J., and Duchon, M.R. (2007). Regulation of redox metabolism in the mouse oocyte and embryo. *Dev. Camb. Engl.* *134*, 455–465.
- Duval, F. (2017). Rôles de l'adiponectine à l'interface foeto-maternelle humaine au cours du premier trimestre de grossesse. phdthesis. Université Paris-Saclay.
- Duval, F., Dos Santos, E., Poidatz, D., Sérazin, V., Gronier, H., Vialard, F., and Dieudonné, M.-N. (2016). Adiponectin Inhibits Nutrient Transporters and Promotes Apoptosis in Human Villous Cytotrophoblasts: Involvement in the Control of Fetal Growth. *Biol. Reprod.* *vol.94*, 1–12.
- Duval, F., Santos, E.D., Moindjie, H., Serazin, V., Swierkowski-Blanchard, N., Vialard, F., and Dieudonné, M.-N. (2017). Adiponectin limits differentiation and trophoblast invasion in human endometrial cells. *J. Mol. Endocrinol.* *59*, 285–297.
- Duval, F., Dos Santos, E., Maury, B., Serazin, V., Fathallah, K., Vialard, F., and Dieudonné, M.-N. (2018). Adiponectin regulates glycogen metabolism at the human fetal-maternal interface. *J. Mol. Endocrinol.*
- Ebihara, K., Ogawa, Y., Isse, N., Mori, K., Tamura, N., Masuzaki, H., Kohno, K., Yura, S., Hosoda, K., Sagawa, N., et al. (1997). Identification of the human leptin 5'-flanking sequences involved in the trophoblast-specific transcription. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *241*, 658–663.
- Edwards, D., Jones, C.J., Sibley, C.P., and Nelson, D.M. (1993). Paracellular permeability pathways in the human placenta: a quantitative and morphological study of maternal-fetal transfer of horseradish peroxidase. *Placenta* *14*, 63–73.

- Engert, S., Rieger, L., Kapp, M., Becker, J.C., Dietl, J., and Kämmerer, U. (2007). Profiling chemokines, cytokines and growth factors in human early pregnancy decidua by protein array. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N* 1989 *58*, 129–137.
- Estienne, A., Bongrani, A., Reverchon, M., Ramé, C., Ducluzeau, P.-H., Froment, P., and Dupont, J. (2019). Involvement of Novel Adipokines, Chemerin, Visfatin, Resistin and Apelin in Reproductive Functions in Normal and Pathological Conditions in Humans and Animal Models. *Int. J. Mol. Sci.* *20*, 4431.
- Evain-Brion, D., Malassiné, A., and Frydman, R. (2010a). *Le placenta humain* (Cachan, France: Ed. Médicales Internationales).
- Evain-Brion, D., Malassiné, A., and Frydman, R. (2010b). *Le placenta humain* (Cachan, France: Ed. Médicales Internationales).
- Faggioni, R., Feingold, K.R., and Grunfeld, C. (2001). Leptin regulation of the immune response and the immunodeficiency of malnutrition. *FASEB J.* *15*, 2565–2571.
- Fain, J.N., Cheema, P.S., Bahouth, S.W., and Lloyd Hiler, M. (2003). Resistin release by human adipose tissue explants in primary culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *300*, 674–678.
- Fallo, F., Scarda, A., Sonino, N., Paoletta, A., Boscaro, M., Pagano, C., Federspil, G., and Vettor, R. (2004). Effect of glucocorticoids on adiponectin: a study in healthy subjects and in Cushing's syndrome. *Eur. J. Endocrinol.* *150*, 339–344.
- Fang, P., Li, X., Dai, J., Cole, L., Camacho, J.A., Zhang, Y., Ji, Y., Wang, J., Yang, X.-F., and Wang, H. (2018). Immune cell subset differentiation and tissue inflammation. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* *11*, 97.
- Farley, D.M., Choi, J., Dudley, D.J., Li, C., Jenkins, S.L., Myatt, L., and Nathanielsz, P.W. (2010). Placental Amino Acid Transport and Placental Leptin Resistance in Pregnancies Complicated by Maternal Obesity. *Placenta* *31*, 718–724.
- Fei, H., Okano, H.J., Li, C., Lee, G.H., Zhao, C., Darnell, R., and Friedman, J.M. (1997). Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 7001–7005.
- Fernandes, C., Grayton, H., Poston, L., Samuelsson, A.-M., Taylor, P.D., Collier, D.A., and Rodriguez, A. (2012). Prenatal exposure to maternal obesity leads to hyperactivity in offspring. *Mol. Psychiatry* *17*, 1159–1160.
- Feuerer, M., Herrero, L., Cipolletta, D., Naaz, A., Wong, J., Nayer, A., Lee, J., Goldfine, A., Benoist, C., Shoelson, S., et al. (2009). Fat Treg cells: a liaison between the immune and metabolic systems. *Nat. Med.* *15*, 930–939.
- Filant, J., and Spencer, T.E. (2014). Uterine glands: biological roles in conceptus implantation, uterine receptivity and decidualization. *Int. J. Dev. Biol.* *58*, 107–116.
- Finn, R., St Hill, C.A., Davis, J.C., Hipkin, L.J., and Harvey, M. (1977). Feto-maternal bidirectional mixed lymphocyte reaction and survival of fetal allograft. *Lancet Lond. Engl.* *2*, 1200–1202.
- Fisher, S.J., and Damsky, C.H. (1993). Human cytotrophoblast invasion. *Semin. Cell Biol.* *4*, 183–188.
- Fitzsimons, K.J., Modder, J., and Greer, I.A. (2009). Obesity in pregnancy: risks and management. *Obstet. Med.* *2*, 52–62.
- Fluhr, H., Bischof-Islami, D., Krenzer, S., Licht, P., Bischof, P., and Zygmunt, M. (2008). Human chorionic gonadotropin stimulates matrix metalloproteinases-2 and -9 in cytotrophoblastic cells and decreases tissue inhibitor of metalloproteinases-1, -2, and -3 in decidualized endometrial stromal cells. *Fertil. Steril.* *90*, 1390–1395.
- Fontana, V.A., Sanchez, M., Cebal, E., and Calvo, J.C. (2010a). Interferon-gamma inhibits metalloproteinase activity and cytotrophoblast cell migration. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N* 1989 *64*, 20–26.
- Fontana, V.A., Sanchez, M., Cebal, E., and Calvo, J.C. (2010b). Interleukin-1 beta regulates metalloproteinase activity and leptin secretion in a cytotrophoblast model. *Biocell Off. J. Soc. Latinoam. Microsc. Electron. AI* *34*, 37–43.
- Foretz, M., Taleux, N., Guigas, B., Horman, S., Beauloye, C., Andreelli, F., Bertrand, L., and Viollet, B. (2006). [Regulation of energy metabolism by AMPK: a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic and cardiovascular diseases]. *Med. Sci. MS* *22*, 381–388.
- Fournier, T. (2016). Human chorionic gonadotropin: Different glycoforms and biological activity depending on its source of production. *Ann. Endocrinol.* *77*, 75–81.
- Fowler, P.A., Evans, L.W., Groome, N.P., Templeton, A., and Knight, P.G. (1998). A longitudinal study of maternal serum inhibin-A, inhibin-B, activin-A, activin-AB, pro-alphaC and follistatin during pregnancy. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *13*, 3530–3536.
- Frankenne, F., Alsat, E., Scippo, M.L., Igout, A., Hennen, G., and Evain-Brion, D. (1992). Evidence for the expression of growth hormone receptors in human placenta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *182*, 481–486.

- Frendo, J.-L., Olivier, D., Cheynet, V., Blond, J.-L., Bouton, O., Vidaud, M., Rabreau, M., Evain-Brion, D., and Mallet, F. (2003). Direct involvement of HERV-W Env glycoprotein in human trophoblast cell fusion and differentiation. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 3566–3574.
- Frias, A.E., Morgan, T.K., Evans, A.E., Rasanen, J., Oh, K.Y., Thornburg, K.L., and Grove, K.L. (2011). Maternal high-fat diet disturbs uteroplacental hemodynamics and increases the frequency of stillbirth in a nonhuman primate model of excess nutrition. *Endocrinology* *152*, 2456–2464.
- Frühbeck, G. (2006). Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem. J.* *393*, 7–20.
- Fu, Y., Luo, N., Klein, R.L., and Garvey, W.T. (2005). Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *J. Lipid Res.* *46*, 1369–1379.
- Fujikawa, T., Chuang, J.-C., Sakata, I., Ramadori, G., and Coppari, R. (2010). Leptin therapy improves insulin-deficient type 1 diabetes by CNS-dependent mechanisms in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 17391–17396.
- Fukuhara, A., Matsuda, M., Nishizawa, M., Segawa, K., Tanaka, M., Kishimoto, K., Matsuki, Y., Murakami, M., Ichisaka, T., Murakami, H., et al. (2005). Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* *307*, 426–430.
- Fungfuang, W., Terada, M., Komatsu, N., Moon, C., and Saito, T.R. (2013). Effects of estrogen on food intake, serum leptin levels and leptin mRNA expression in adipose tissue of female rats. *Lab. Anim. Res.* *29*, 168–173.
- Furesz, T.C., Moe, A.J., and Smith, C.H. (1995). Lysine uptake by human placental microvillous membrane: comparison of system y+ with basal membrane. *Am. J. Physiol.* *268*, C755-761.
- Gaccioli, F., Aye, I.L.M.H., Roos, S., Lager, S., Ramirez, V.I., Kanai, Y., Powell, T.L., and Jansson, T. (2015a). Expression and functional characterisation of System L amino acid transporters in the human term placenta. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* *13*.
- Gaccioli, F., Aye, I.L.M.H., Roos, S., Lager, S., Ramirez, V.I., Kanai, Y., Powell, T.L., and Jansson, T. (2015b). Expression and functional characterisation of System L amino acid transporters in the human term placenta. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* *13*.
- Gainsford, T., Willson, T.A., Metcalf, D., Handman, E., McFarlane, C., Ng, A., Nicola, N.A., Alexander, W.S., and Hilton, D.J. (1996). Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 14564–14568.
- Galic, S., Oakhill, J.S., and Steinberg, G.R. (2010). Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol. Cell. Endocrinol.* *316*, 129–139.
- Gallardo, N., Bonzón-Kulichenko, E., Fernández-Agulló, T., Moltó, E., Gómez-Alonso, S., Blanco, P., Carrascosa, J.M., Ros, M., and Andrés, A. (2007). Tissue-Specific Effects of Central Leptin on the Expression of Genes Involved in Lipid Metabolism in Liver and White Adipose Tissue. *Endocrinology* *148*, 5604–5610.
- Gambino, Y.P., Maymó, J.L., Pérez-Pérez, A., Dueñas, J.L., Sánchez-Margalet, V., Calvo, J.C., and Varone, C.L. (2010). 17Beta-Estradiol Enhances Leptin Expression in Human Placental Cells Through Genomic and Nongenomic Actions. *Biol. Reprod.* *83*, 42–51.
- Gambino, Y.P., Pérez Pérez, A., Dueñas, J.L., Calvo, J.C., Sánchez-Margalet, V., and Varone, C.L. (2012). Regulation of leptin expression by 17beta-estradiol in human placental cells involves membrane associated estrogen receptor alpha. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1823*, 900–910.
- Gamundi-Segura, S., Serna, J., Oehninger, S., Horcajadas, J.A., and Arbones-Mainar, J.M. (2015). Effects of adipocyte-secreted factors on decidualized endometrial cells: modulation of endometrial receptivity in vitro. *J. Physiol. Biochem.* *71*, 537–546.
- Gant-Branum, R.L., Broussard, J.A., Mahsut, A., Webb, D.J., and McLean, J.A. (2010). Identification of phosphorylation sites within the signaling adaptor APPL1 by mass spectrometry. *J. Proteome Res.* *9*, 1541–1548.
- Gantz, I., Konda, Y., Yang, Y.K., Miller, D.E., Dierick, H.A., and Yamada, T. (1996). Molecular cloning of a novel receptor (CMKLR1) with homology to the chemotactic factor receptors. *Cytogenet. Cell Genet.* *74*, 286–290.
- Gao, L., Lv, C., Xu, C., Li, Y., Cui, X., Gu, H., and Ni, X. (2012). Differential regulation of glucose transporters mediated by CRH receptor type 1 and type 2 in human placental trophoblasts. *Endocrinology* *153*, 1464–1471.
- Garcia, D., and Shaw, R.J. (2017). AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance. *Mol. Cell* *66*, 789–800.
- Garner, P.R., and Armstrong, D.T. (1977). The effect of human chorionic gonadotropin and estradiol-17beta on the maintenance of the human corpus luteum of early pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *128*, 469–475.

- Gauster, M., Maninger, S., Siwetz, M., Deutsch, A., El-Heliebi, A., Kolb-Lenz, D., Hiden, U., Desoye, G., Herse, F., and Prokesch, A. (2017). Downregulation of p53 drives autophagy during human trophoblast differentiation. *Cell. Mol. Life Sci.* 1–17.
- Ge, H., Huang, L., Pourbahrami, T., and Li, C. (2002). Generation of soluble leptin receptor by ectodomain shedding of membrane-spanning receptors in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 277, 45898–45903.
- Ge, Y.C., Li, J.N., Ni, X.T., Guo, C.M., Wang, W.S., Duan, T., and Sun, K. (2011). Cross talk between cAMP and p38 MAPK pathways in the induction of leptin by hCG in human placental syncytiotrophoblasts. *Reproduction* 142, 369–375.
- Gerbaud, P., Pidoux, G., Guibourdenche, J., Pathirage, N., Costa, J.M., Badet, J., Frenedo, J.-L., Murthi, P., and Evain-Brion, D. (2011). Mesenchymal activin-A overcomes defective human trisomy 21 trophoblast fusion. *Endocrinology* 152, 5017–5028.
- Gerber, M., Boettner, A., Seidel, B., Lammert, A., Bär, J., Schuster, E., Thiery, J., Kiess, W., and Kratzsch, J. (2005). Serum resistin levels of obese and lean children and adolescents: biochemical analysis and clinical relevance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 4503–4509.
- Gesink Law, D.C., Macle hose, R.F., and Longnecker, M.P. (2007). Obesity and time to pregnancy. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 22, 414–420.
- Getsios, S., and MacCalman, C.D. (2003). Cadherin-11 modulates the terminal differentiation and fusion of human trophoblastic cells in vitro. *Dev. Biol.* 257, 41–54.
- Gil-Sánchez, A., Demmelmair, H., Parrilla, J.J., Koletzko, B., and Larqué, E. (2011). Mechanisms Involved in the Selective Transfer of Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids to the Fetus. *Front. Genet.* 2.
- Gimeno, R.E., Hirsch, D.J., Punreddy, S., Sun, Y., Ortegon, A.M., Wu, H., Daniels, T., Stricker-Krongrad, A., Lodish, H.F., and Stahl, A. (2003). Targeted Deletion of Fatty Acid Transport Protein-4 Results in Early Embryonic Lethality. *J. Biol. Chem.* 278, 49512–49516.
- Giudice, L.C. (1992). Insulin-like growth factors and ovarian follicular development. *Endocr. Rev.* 13, 641–669.
- Golic, M., Luft, F.C., and Dechend, R. (2016). Tumor Necrosis Factor- α , Uterine Natural Killer Cells, and Pregnancy. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 68, 1108–1109.
- Gomez-Chang, E., Espinosa-Garcia, M.T., Olvera-Sanchez, S., Flores-Herrera, O., and Martinez, F. (2014). PKA tightly bound to human placental mitochondria participates in steroidogenesis and is not modified by cAMP. *Placenta* 35, 748–762.
- González, R.R., Simón, C., Caballero-Campo, P., Norman, R., Chardonens, D., Devoto, L., and Bischof, P. (2000). Leptin and reproduction. *Hum. Reprod. Update* 6, 290–300.
- Goralski, K.B., McCarthy, T.C., Hanniman, E.A., Zabel, B.A., Butcher, E.C., Parlee, S.D., Muruganandan, S., and Sinal, C.J. (2007). Chemerin, a Novel Adipokine That Regulates Adipogenesis and Adipocyte Metabolism. *J. Biol. Chem.* 282, 28175–28188.
- Gordon, S., and Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 953–964.
- Gorska, E., Popko, K., Stelmaszczyk-Emmel, A., Ciepiela, O., Kucharska, A., and Wasik, M. (2010). Leptin receptors. *Eur. J. Med. Res.* 15, 50–54.
- Graham, C.H. (1997). Effect of transforming growth factor-beta on the plasminogen activator system in cultured first trimester human cytotrophoblasts. *Placenta* 18, 137–143.
- Grenman, S., Rönne maa, T., Irjala, K., Kaihola, H.L., and Grönroos, M. (1986). Sex Steroid, Gonadotropin, Cortisol, and Prolactin Levels in Healthy, Massively Obese Women: Correlation with Abdominal Fat Cell Size and Effect of Weight Reduction. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 63, 1257–1261.
- Groothuis, P.G., Dassen, H.H.N.M., Romano, A., and Punyadeera, C. (2007). Estrogen and the endometrium: lessons learned from gene expression profiling in rodents and human. *Hum. Reprod. Update* 13, 405–417.
- Grosfeld, A., André, J., Mouzon, S.H., Berra, E., Pouysségur, J., and Guerre-Millo, M. (2002). Hypoxia-inducible Factor 1 Transactivates the Human Leptin Gene Promoter. *J. Biol. Chem.* 277, 42953–42957.
- Guh, D.P., Zhang, W., Bansback, N., Amarsi, Z., Birmingham, C.L., and Anis, A.H. (2009). The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health* 9, 88.
- Guibourdenche, J., Frenedo, J.-L., Pidoux, G., Bertin, G., Luton, D., Muller, F., Porquet, D., and Evain-Brion, D. (2003). Expression of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) during human villous trophoblast differentiation in vitro. *Placenta* 24, 532–539.

- Guo, K., McMinn, J.E., Ludwig, T., Yu, Y.-H., Yang, G., Chen, L., Loh, D., Li, C., Chua, S., and Zhang, Y. (2007). Disruption of Peripheral Leptin Signaling in Mice Results in Hyperleptinemia without Associated Metabolic Abnormalities. *Endocrinology* *148*, 3987–3997.
- Guo, L., Li, Q., Wang, W., Yu, P., Pan, H., Li, P., Sun, Y., and Zhang, J. (2009). Apelin inhibits insulin secretion in pancreatic beta-cells by activation of PI3-kinase-phosphodiesterase 3B. *Endocr. Res.* *34*, 142–154.
- Gurka, G., and Rocklin, R.E. (1987). Reproductive immunology. *JAMA* *258*, 2983–2987.
- Hahn, T., Barth, S., Graf, R., Engelmann, M., Beslagic, D., Reul, J.M., Holsboer, F., Dohr, G., and Desoye, G. (1999). Placental glucose transporter expression is regulated by glucocorticoids. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *84*, 1445–1452.
- Halasz, M., and Szekeres-Bartho, J. (2013). The role of progesterone in implantation and trophoblast invasion. *J. Reprod. Immunol.* *97*, 43–50.
- Hales, C.M., Fryar, C.D., Carroll, M.D., Freedman, D.S., and Ogden, C.L. (2018). Trends in Obesity and Severe Obesity Prevalence in US Youth and Adults by Sex and Age, 2007-2008 to 2015-2016. *JAMA* *319*, 1723–1725.
- Hamilton, B.S., Paglia, D., Kwan, A.Y., and Deitel, M. (1995). Increased obese mRNA expression in omental fat cells from massively obese humans. *Nat. Med.* *1*, 953–956.
- Hamilton, G.S., Lysiak, J.J., Han, V.K., and Lala, P.K. (1998). Autocrine-paracrine regulation of human trophoblast invasiveness by insulin-like growth factor (IGF)-II and IGF-binding protein (IGFBP)-1. *Exp. Cell Res.* *244*, 147–156.
- Handschuh, K., Guibourdenche, J., Guesnon, M., Laurendeau, I., Evain-Brion, D., and Fournier, T. (2006). Modulation of PAPP-A expression by PPARgamma in human first trimester trophoblast. *Placenta* *27 Suppl A*, S127-134.
- Handwerger, S., and Freemark, M. (2000). The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab. JPEM* *13*, 343–356.
- Hanna, J., Goldman-Wohl, D., Hamani, Y., Avraham, I., Greenfield, C., Natanson-Yaron, S., Prus, D., Cohen-Daniel, L., Arnon, T.I., Manaster, I., et al. (2006). Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat. Med.* *12*, 1065.
- Hardie, L.J., Guilhot, N., and Trayhurn, P. (1996). Regulation of leptin production in cultured mature white adipocytes. *Horm. Metab. Res. Horm. Stoffwechselforschung Horm. Metab.* *28*, 685–689.
- Harman, I., Costello, A., Sane, A., and Handwerger, S. (1987). Cyclic adenosine-3',5'-monophosphate stimulates the acute release of placental lactogen from human trophoblast cells. *Endocrinology* *121*, 59–63.
- Harris, L.K. (2010). Review: Trophoblast-vascular cell interactions in early pregnancy: how to remodel a vessel. *Placenta* *31 Suppl*, S93-98.
- Harris, R.B. (2000). Leptin—much more than a satiety signal. *Annu. Rev. Nutr.* *20*, 45–75.
- Hastie, R., and Lappas, M. (2014). The effect of pre-existing maternal obesity and diabetes on placental mitochondrial content and electron transport chain activity. *Placenta* *35*, 673–683.
- Hatanaka, T., Huang, W., Wang, H., Sugawara, M., Prasad, P.D., Leibach, F.H., and Ganapathy, V. (2000). Primary structure, functional characteristics and tissue expression pattern of human ATA2, a subtype of amino acid transport system A. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1467*, 1–6.
- Hatanaka, T., Huang, W., Ling, R., Prasad, P.D., Sugawara, M., Leibach, F.H., and Ganapathy, V. (2001). Evidence for the transport of neutral as well as cationic amino acids by ATA3, a novel and liver-specific subtype of amino acid transport system A. *Biochim. Biophys. Acta* *1510*, 10–17.
- Hauguel-de Mouzon, S., Challier, J.C., Kacemi, A., Caüzac, M., Malek, A., and Girard, J. (1997). The GLUT3 glucose transporter isoform is differentially expressed within human placental cell types. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *82*, 2689–2694.
- Haynes, W.G., Sivitz, W.I., Morgan, D.A., Walsh, S.A., and Mark, A.L. (1997). Sympathetic and cardiorenal actions of leptin. *Hypertens. Dallas Tex* *1979* *30*, 619–623.
- Helland, I.B., Reseland, J.E., Saugstad, O.D., and Drevon, C.A. (1998). Leptin levels in pregnant women and newborn infants: gender differences and reduction during the neonatal period. *Pediatrics* *101*, E12.
- Henry, B.A., and Clarke, I.J. (2008). Adipose Tissue Hormones and the Regulation of Food Intake. *J. Neuroendocrinol.* *20*, 842–849.

- Higuchi, T., Kanzaki, H., Nakayama, H., Fujimoto, M., Hatayama, H., Kojima, K., Iwai, M., Mori, T., and Fujita, J. (1995). Induction of tissue inhibitor of metalloproteinase 3 gene expression during in vitro decidualization of human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 136, 4973–4981.
- Hileman, S.M., Pierroz, D.D., Masuzaki, H., Bjørbaek, C., El-Haschimi, K., Banks, W.A., and Flier, J.S. (2002). Characterization of short isoforms of the leptin receptor in rat cerebral microvessels and of brain uptake of leptin in mouse models of obesity. *Endocrinology* 143, 775–783.
- Hill, D.J., Crace, C.J., and Milner, R.D. (1985). Incorporation of [3H]thymidine by isolated fetal myoblasts and fibroblasts in response to human placental lactogen (HPL): possible mediation of HPL action by release of immunoreactive SM-C. *J. Cell. Physiol.* 125, 337–344.
- Hill, J.O., Wyatt, H.R., and Peters, J.C. (2012). Energy balance and obesity. *Circulation* 126, 126–132.
- Hill, M.J., Ueyehara, C.F.T., Hashiro, G.M., and Frattarelli, J.L. (2007). The utility of serum leptin and follicular fluid leptin, estradiol, and progesterone levels during an in vitro fertilization cycle. *J. Assist. Reprod. Genet.* 24, 183–188.
- Hochberg, Z., Perlman, R., Brandes, J.M., and Benderli, A. (1983). Insulin regulates placental lactogen and estradiol secretion by cultured human term trophoblast. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 57, 1311–1313.
- Hochberg, Z., Bick, T., and Perlman, R. (1988). Two pathways of placental lactogen secretion by cultured human trophoblast. *Biochem. Med. Metab. Biol.* 39, 111–116.
- Hoeltzli, S.D., and Smith, C.H. (1989). Alanine transport systems in isolated basal plasma membrane of human placenta. *Am. J. Physiol.* 256, C630-637.
- Holland, O., Dekker Nitert, M., Gallo, L.A., Vejzovic, M., Fisher, J.J., and Perkins, A.V. (2017). Review: Placental mitochondrial function and structure in gestational disorders. *Placenta*.
- Holzman, I.R., Lemons, J.A., Meschia, G., and Battaglia, F.C. (1979). Uterine uptake of amino acids and placental glutamine--glutamate balance in the pregnant ewe. *J. Dev. Physiol.* 1, 137–149.
- Horgan, A.M., and Stork, P.J.S. (2003). Examining the mechanism of Erk nuclear translocation using green fluorescent protein. *Exp. Cell Res.* 285, 208–220.
- Hotamisligil, G.S. (1999). The role of TNF α and TNF receptors in obesity and insulin resistance. *J. Intern. Med.* 245, 621–625.
- Hotamisligil, G.S., Peraldi, P., Budavari, A., Ellis, R., White, M.F., and Spiegelman, B.M. (1996). IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science* 271, 665–668.
- Howard, J.K., Lord, G.M., Matarese, G., Vendetti, S., Ghatei, M.A., Ritter, M.A., Lechler, R.I., and Bloom, S.R. (1999). Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in ob/ob mice. *J. Clin. Invest.* 104, 1051–1059.
- Howe, L.R., Subbaramaiah, K., Hudis, C.A., and Dannenberg, A.J. (2013). Molecular pathways: adipose inflammation as a mediator of obesity-associated cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 19, 6074–6083.
- Hu, E., Liang, P., and Spiegelman, B.M. (1996). AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J. Biol. Chem.* 271, 10697–10703.
- Huang, Z., Luo, X., Liu, M., and Chen, L. (2019). Function and regulation of apelin/APJ system in digestive physiology and pathology. *J. Cell. Physiol.* 234, 7796–7810.
- Hunt, J.S., and Orr, H.T. (1992). HLA and maternal-fetal recognition. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 6, 2344–2348.
- Hunt, J.S., Pace, J.L., and Gill, R.M. (2010). Immunoregulatory molecules in human placentas: potential for diverse roles in pregnancy. *Int. J. Dev. Biol.* 54, 457–467.
- Huppertz, B., Sammar, M., Chefetz, I., Neumaier-Wagner, P., Bartz, C., and Meiri, H. (2008). Longitudinal determination of serum placental protein 13 during development of preeclampsia. *Fetal Diagn. Ther.* 24, 230–236.
- Huppertz, B., Meiri, H., Gizurarson, S., Osol, G., and Sammar, M. (2013). Placental protein 13 (PP13): a new biological target shifting individualized risk assessment to personalized drug design combating pre-eclampsia. *Hum. Reprod. Update* 19, 391–405.
- Hursting, S.D., and Hursting, M.J. (2012). Growth signals, inflammation, and vascular perturbations: mechanistic links between obesity, metabolic syndrome, and cancer. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 1766–1770.

- Ikedo, Y., Tsuchiya, H., Hama, S., Kajimoto, K., and Kogure, K. (2013). Resistin affects lipid metabolism during adipocyte maturation of 3T3-L1 cells. *FEBS J.* 280, 5884–5895.
- Illsley, N.P. (2000). CURRENT TOPIC: Glucose Transporters in the Human Placenta. *Placenta* 21, 14–22.
- Imagawa, A., Funahashi, T., Nakamura, T., Moriwaki, M., Tanaka, S., Nishizawa, H., Sayama, K., Uno, S., Iwahashi, H., Yamagata, K., et al. (2002). Elevated serum concentration of adipose-derived factor, adiponectin, in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 25, 1665–1666.
- Imbeault, P., Pomerleau, M., Harper, M.E., and Doucet, E. (2004). Unchanged fasting and postprandial adiponectin levels following a 4-day caloric restriction in young healthy men. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 60, 429–433.
- Islami, D., Chardonnens, D., Campana, A., and Bischof, P. (2001). Comparison of the effects of GnRH-I and GnRH-II on HCG synthesis and secretion by first trimester trophoblast. *Mol. Hum. Reprod.* 7, 3–9.
- Islami, D., Bischof, P., and Chardonnens, D. (2003). Modulation of placental vascular endothelial growth factor by leptin and hCG. *Mol. Hum. Reprod.* 9, 395–398.
- Iwabu, M., Yamauchi, T., Okada-Iwabu, M., Sato, K., Nakagawa, T., Funata, M., Yamaguchi, M., Namiki, S., Nakayama, R., Tabata, M., et al. (2010). Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1 α and mitochondria by Ca²⁺ and AMPK/SIRT1. *Nature* 464, 1313–1319.
- Jain, A., Polotsky, A.J., Rochester, D., Berga, S.L., Loucks, T., Zeitlian, G., Gibbs, K., Polotsky, H.N., Feng, S., Isaac, B., et al. (2007). Pulsatile Luteinizing Hormone Amplitude and Progesterone Metabolite Excretion Are Reduced in Obese Women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 2468–2473.
- Jansson, T. (2001). Amino Acid Transporters in the Human Placenta. *Pediatr. Res.* 49, 141–147.
- Jansson, T., and Powell, T.L. (2013). Role of placental nutrient sensing in developmental programming. *Clin. Obstet. Gynecol.* 56, 591–601.
- Jansson, N., Greenwood, S.L., Johansson, B.R., Powell, T.L., and Jansson, T. (2003). Leptin Stimulates the Activity of the System A Amino Acid Transporter in Human Placental Villous Fragments. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 1205–1211.
- Jansson, N., Rosario, F.J., Gaccioli, F., Lager, S., Jones, H.N., Roos, S., Jansson, T., and Powell, T.L. (2012). Activation of Placental mTOR Signaling and Amino Acid Transporters in Obese Women Giving Birth to Large Babies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98, 105–113.
- Jansson, T., Wennergren, M., and Illsley, N.P. (1993). Glucose transporter protein expression in human placenta throughout gestation and in intrauterine growth retardation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77, 1554–1562.
- Jansson, T., Cowley, E.A., and Illsley, N.P. (1995). Cellular localization of glucose transporter messenger RNA in human placenta. *Reprod. Fertil. Dev.* 7, 1425–1430.
- Ji, L., Brkić, J., Liu, M., Fu, G., Peng, C., and Wang, Y.-L. (2013). Placental trophoblast cell differentiation: physiological regulation and pathological relevance to preeclampsia. *Mol. Aspects Med.* 34, 981–1023.
- Jin, L., Burguera, B.G., Couce, M.E., Scheithauer, B.W., Lamsan, J., Eberhardt, N.L., Kulig, E., and Lloyd, R.V. (1999). Leptin and leptin receptor expression in normal and neoplastic human pituitary: evidence of a regulatory role for leptin on pituitary cell proliferation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 2903–2911.
- Johnson, L.W., and Smith, C.H. (1988). Neutral amino acid transport systems of microvillous membrane of human placenta. *Am. J. Physiol.* 254, C773–780.
- Jones, H.N., Jansson, T., and Powell, T.L. (2009). IL-6 stimulates system A amino acid transporter activity in trophoblast cells through STAT3 and increased expression of SNAT2. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 297, C1228–C1235.
- Jones, H.N., Jansson, T., and Powell, T.L. (2010). Full-Length Adiponectin Attenuates Insulin Signaling and Inhibits Insulin-Stimulated Amino Acid Transport in Human Primary Trophoblast Cells. *Diabetes* 59, 1161–1170.
- Jones, R.L., Salamonsen, L.A., and Findlay, J.K. (2002). Activin A promotes human endometrial stromal cell decidualization in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 4001–4004.
- Jones, R.L., Findlay, J.K., Farnworth, P.G., Robertson, D.M., Wallace, E., and Salamonsen, L.A. (2006). Activin A and inhibin A differentially regulate human uterine matrix metalloproteinases: potential interactions during decidualization and trophoblast invasion. *Endocrinology* 147, 724–732.
- Jornayvaz, F.R., and Shulman, G.I. (2010). Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem.* 47, 69–84.

- Jung, Y.-J., Isaacs, J.S., Lee, S., Trepel, J., and Neckers, L. (2003). IL-1beta-mediated up-regulation of HIF-1alpha via an NFkappaB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *17*, 2115–2117.
- Jungheim, E.S., Schoeller, E.L., Marquard, K.L., Loudon, E.D., Schaffer, J.E., and Moley, K.H. (2010). Diet-induced obesity model: abnormal oocytes and persistent growth abnormalities in the offspring. *Endocrinology* *151*, 4039–4046.
- Jungheim, E.S., Macones, G.A., Odem, R.R., Patterson, B.W., Lanzendorf, S.E., Ratts, V.S., and Moley, K.H. (2011). Associations between free fatty acids, cumulus oocyte complex morphology and ovarian function during in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* *95*, 1970–1974.
- Jungheim, E.S., Travieso, J.L., and Hopeman, M.M. (2013). Weighing the impact of obesity on female reproductive function and fertility. *Nutr. Rev.* *71 Suppl 1*, S3-8.
- Kamath, S.G., Furesz, T.C., Way, B.A., and Smith, C.H. (1999). Identification of three cationic amino acid transporters in placental trophoblast: cloning, expression, and characterization of hCAT-1. *J. Membr. Biol.* *171*, 55–62.
- Kämmerer, U., Eggert, A.O., Kapp, M., McLellan, A.D., Geijtenbeek, T.B.H., Dietl, J., van Kooyk, Y., and Kämpgen, E. (2003). Unique appearance of proliferating antigen-presenting cells expressing DC-SIGN (CD209) in the decidua of early human pregnancy. *Am. J. Pathol.* *162*, 887–896.
- Kane, N., Kelly, R., Saunders, P.T.K., and Critchley, H.O.D. (2009). Proliferation of uterine natural killer cells is induced by human chorionic gonadotropin and mediated via the mannose receptor. *Endocrinology* *150*, 2882–2888.
- Kaneko, H., Anzai, T., Nagai, T., Anzai, A., Takahashi, T., Mano, Y., Morimoto, K., Maekawa, Y., Itoh, H., Yoshikawa, T., et al. (2011). Human C-reactive protein exacerbates metabolic disorders in association with adipose tissue remodelling. *Cardiovasc. Res.* *91*, 546–555.
- Karbowska, J., and Kochan, Z. (2006). Role of adiponectin in the regulation of carbohydrate and lipid metabolism. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* *57 Suppl 6*, 103–113.
- Karl, P.I., and Fisher, S.E. (1990). Taurine transport by microvillous membrane vesicles and the perfused cotyledon of the human placenta. *Am. J. Physiol.* *258*, C443-451.
- Karl, P.I., Teichberg, S., and Fisher, S.E. (1991). Na(+)-dependent amino acid uptake by human placental microvillous membrane vesicles: importance of storage conditions and preservation of cytoskeletal elements. *Placenta* *12*, 239–250.
- Karl, P.I., Alpy, K.L., and Fisher, S.E. (1992). Amino acid transport by the cultured human placental trophoblast: effect of insulin on AIB transport. *Am. J. Physiol.* *262*, C834-839.
- Kaser, S., Tatarczyk, T., Stadlmayr, A., Ciardi, C., Röss, C., Tschoner, A., Sandhofer, A., Paulweber, B., Ebenbichler, C.F., and Patsch, J.R. (2008). Effect of obesity and insulin sensitivity on adiponectin isoform distribution. *Eur. J. Clin. Invest.* *38*, 827–834.
- Kasher-Meron, M., Mazaki-Tovi, S., Barhod, E., Hemi, R., Haas, J., Gat, I., Zilberberg, E., Yinon, Y., Karasik, A., and Kanety, H. (2014). Chemerin concentrations in maternal and fetal compartments: implications for metabolic adaptations to normal human pregnancy. *J. Perinat. Med.* *42*, 371–378.
- Kaufmann, P., Schröder, H., and Leichtweiss, H.P. (1982). Fluid shift across the placenta: II. Fetomaternal transfer of horseradish peroxidase in the guinea pig. *Placenta* *3*, 339–348.
- Kazantzis, M., and Stahl, A. (2012). Fatty acid transport proteins, implications in physiology and disease. *Biochim. Biophys. Acta* *1821*, 852–857.
- Kern, L., Mittenbühler, M.J., Vesting, A.J., Ostermann, A.L., Wunderlich, C.M., and Wunderlich, F.T. (2018). Obesity-Induced TNF α and IL-6 Signaling: The Missing Link between Obesity and Inflammation—Driven Liver and Colorectal Cancers. *Cancers* *11*.
- Kershaw, E.E., and Flier, J.S. (2004a). Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *89*, 2548–2556.
- Kershaw, E.E., and Flier, J.S. (2004b). Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *89*, 2548–2556.
- Kertschanska, S., Stulcová, B., Kaufmann, P., and Stulc, J. (2000). Distensible trans-trophoblastic channels in the rat placenta. *Placenta* *21*, 670–677.
- Kiezun, M., Smolinska, N., Maleszka, A., Dobrzyn, K., Szeszko, K., and Kaminski, T. (2014). Adiponectin expression in the porcine pituitary during the estrous cycle and its effect on LH and FSH secretion. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *307*, E1038-1046.

- Kim, C.-S., Park, H.-S., Kawada, T., Kim, J.-H., Lim, D., Hubbard, N.E., Kwon, B.-S., Erickson, K.L., and Yu, R. (2006). Circulating levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters. *Int. J. Obes.* 2005 30, 1347–1355.
- Kim, D.W., Young, S.L., Grattan, D.R., and Jasoni, C.L. (2014). Obesity During Pregnancy Disrupts Placental Morphology, Cell Proliferation, and Inflammation in a Sex-Specific Manner Across Gestation in the Mouse. *Biol. Reprod.* 90.
- Kim, K.W., Zhao, L., Donato, J., Kohno, D., Xu, Y., Elias, C.F., Lee, C., Parker, K.L., and Elmquist, J.K. (2011). Steroidogenic factor 1 directs programs regulating diet-induced thermogenesis and leptin action in the ventral medial hypothalamic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 10673–10678.
- Kim, K.W., Donato, J., Berglund, E.D., Choi, Y.-H., Kohno, D., Elias, C.F., Depinho, R.A., and Elmquist, J.K. (2012). FOXO1 in the ventromedial hypothalamus regulates energy balance. *J. Clin. Invest.* 122, 2578–2589.
- Kirchgessner, T.G., Uysal, K.T., Wiesbrock, S.M., Marino, M.W., and Hotamisligil, G.S. (1997). Tumor necrosis factor- α contributes to obesity-related hyperleptinemia by regulating leptin release from adipocytes. *J. Clin. Invest.* 100, 2777–2782.
- Kitade, H., Sawamoto, K., Nagashimada, M., Inoue, H., Yamamoto, Y., Sai, Y., Takamura, T., Yamamoto, H., Miyamoto, K., Ginsberg, H.N., et al. (2012). CCR5 plays a critical role in obesity-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance by regulating both macrophage recruitment and M1/M2 status. *Diabetes* 61, 1680–1690.
- Kleiblová, P., Springer, D., and Haluzík, M. (2006). The influence of hormonal changes during menstrual cycle on serum adiponectin concentrations in healthy women. *Physiol. Res.* 55, 661–666.
- Kliman, H.J., Sammar, M., Grimpel, Y.I., Lynch, S.K., Milano, K.M., Pick, E., Bejar, J., Arad, A., Lee, J.J., Meiri, H., et al. (2012). Placental protein 13 and decidual zones of necrosis: an immunologic diversion that may be linked to preeclampsia. *Reprod. Sci. Thousand Oaks Calif* 19, 16–30.
- Kniss, D.A., Shubert, P.J., Zimmerman, P.D., Landon, M.B., and Gabbe, S.G. (1994). Insulinlike growth factors. Their regulation of glucose and amino acid transport in placental trophoblasts isolated from first-trimester chorionic villi. *J. Reprod. Med.* 39, 249–256.
- Knöfler, M., Saleh, L., Strohmmer, H., Husslein, P., and Wolschek, M.F. (1999). Cyclic AMP- and differentiation-dependent regulation of the proximal alphaHCG gene promoter in term villous trophoblasts. *Mol. Hum. Reprod.* 5, 573–580.
- Koch, C.E., Lowe, C., Pretz, D., Steger, J., Williams, L.M., and Tups, A. (2014). High-fat diet induces leptin resistance in leptin-deficient mice. *J. Neuroendocrinol.* 26, 58–67.
- Kopcow, H.D., Allan, D.S.J., Chen, X., Rybalov, B., Andzelm, M.M., Ge, B., and Strominger, J.L. (2005). Human decidual NK cells form immature activating synapses and are not cytotoxic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 15563–15568.
- Kralisch, S., Weise, S., Sommer, G., Lipfert, J., Lossner, U., Bluher, M., Stumvoll, M., and Fasshauer, M. (2009). Interleukin-1 β induces the novel adipokine chemerin in adipocytes in vitro. *Regul. Pept.* 154, 102–106.
- de Kretser, D.M., Hedger, M.P., Loveland, K.L., and Phillips, D.J. (2002). Inhibins, activins and follistatin in reproduction. *Hum. Reprod. Update* 8, 529–541.
- Kudo, Y., and Boyd, C.A.R. (2001). Characterisation of l-tryptophan transporters in human placenta: a comparison of brush border and basal membrane vesicles. *J. Physiol.* 531, 405–416.
- Kumar, A., Mohan, S., Newton, J., Rehage, M., Tran, K., Baylink, D.J., and Qin, X. (2005). Pregnancy-associated plasma protein-A regulates myoblast proliferation and differentiation through an insulin-like growth factor-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 280, 37782–37789.
- La Cava, A., and Matarese, G. (2004). The weight of leptin in immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 371–379.
- Lacroix, M.-C., Guibourdenche, J., Fournier, T., Laurendeau, I., Igout, A., Goffin, V., Pantel, J., Tsatsaris, V., and Evain-Brion, D. (2005). Stimulation of human trophoblast invasion by placental growth hormone. *Endocrinology* 146, 2434–2444.
- Lager, S., and Powell, T.L. (2012). Regulation of Nutrient Transport across the Placenta. *J. Pregnancy* 2012, e179827.
- Lager, S., Jansson, N., Olsson, A.L., Wennergren, M., Jansson, T., and Powell, T.L. (2011). Effect of IL-6 and TNF- α on fatty acid uptake in cultured human primary trophoblast cells. *Placenta* 32, 121–127.
- Lager, S., Jansson, T., and Powell, T.L. (2014). Differential regulation of placental amino acid transport by saturated and unsaturated fatty acids. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 307, C738–C744.

- Lagos, C., Aguilera, S., Carvajal, P., Jara, D., Castro, I., González, S., Urzua, U., Barrera, M.J., Molina, C., Leyton, C., et al. (2018). FRI0290 Pro-inflammatory cytokines promote global and gene-specific changes in dna methylation in salivary glands from sjÖgren's syndrome patients. *Ann. Rheum. Dis.* *77*, 682–682.
- Lam, Q.L.K., Liu, S., Cao, X., and Lu, L. (2006). Involvement of leptin signaling in the survival and maturation of bone marrow-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* *36*, 3118–3130.
- Lam, Q.L.K., Wang, S., Ko, O.K.H., Kincade, P.W., and Lu, L. (2010). Leptin signaling maintains B-cell homeostasis via induction of Bcl-2 and Cyclin D1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 13812–13817.
- Lammert, A., Kiess, W., Bottner, A., Glasow, A., and Kratzsch, J. (2001). Soluble leptin receptor represents the main leptin binding activity in human blood. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *283*, 982–988.
- Landt, M. (2000). Leptin Binding and Binding Capacity in Serum. *Clin. Chem.* *46*, 379–384.
- Lanfranco, F., Zitzmann, M., Simoni, M., and Nieschlag, E. (2004). Serum adiponectin levels in hypogonadal males: influence of testosterone replacement therapy. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* *60*, 500–507.
- Lappas, M., Yee, K., Permezel, M., and Rice, G.E. (2005). Release and regulation of leptin, resistin and adiponectin from human placenta, fetal membranes, and maternal adipose tissue and skeletal muscle from normal and gestational diabetes mellitus-complicated pregnancies. *J. Endocrinol.* *186*, 457–465.
- Larqué, E., Krauss-Etschmann, S., Campoy, C., Hartl, D., Linde, J., Klingler, M., Demmelmair, H., Caño, A., Gil, A., Bondy, B., et al. (2006). Docosahexaenoic acid supply in pregnancy affects placental expression of fatty acid transport proteins. *Am. J. Clin. Nutr.* *84*, 853–861.
- Larqué, E., Demmelmair, H., Gil-Sánchez, A., Prieto-Sánchez, M.T., Blanco, J.E., Pagán, A., Faber, F.L., Zamora, S., Parrilla, J.J., and Koletzko, B. (2011). Placental transfer of fatty acids and fetal implications. *Am. J. Clin. Nutr.* *94*, 1908S-1913S.
- Larsson, H., and Ahrén, B. (1996). Short-term dexamethasone treatment increases plasma leptin independently of changes in insulin sensitivity in healthy women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *81*, 4428–4432.
- Lash, G.E., Naruse, K., Innes, B.A., Robson, S.C., Searle, R.F., and Bulmer, J.N. (2010). Secretion of angiogenic growth factors by villous cytotrophoblast and extravillous trophoblast in early human pregnancy. *Placenta* *31*, 545–548.
- Lash, G.E., Pitman, H., Morgan, H.L., Innes, B.A., Agwu, C.N., and Bulmer, J.N. (2016). Decidual macrophages: key regulators of vascular remodeling in human pregnancy. *J. Leukoc. Biol.* *100*, 315–325.
- Laskarin, G., Redzović, A., Rubesa, Z., Mantovani, A., Allavena, P., Haller, H., Vlastelić, I., and Rukavina, D. (2008). Decidual natural killer cell tuning by autologous dendritic cells. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N* *1989* *59*, 433–445.
- Laue, T., Wrann, C.D., Hoffmann-Castendiek, B., Pietsch, D., Hübner, L., and Kielstein, H. (2015). Altered NK cell function in obese healthy humans. *BMC Obes.* *2*.
- Lawrence, J.B., Oxvig, C., Overgaard, M.T., Sottrup-Jensen, L., Gleich, G.J., Hays, L.G., Yates, J.R., and Conover, C.A. (1999). The insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein-A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 3149–3153.
- Le Bouteiller, P., and Tabiasco, J. (2006). [Immunology of pregnancy: renewed interest]. *Med. Sci.* *MS* *22*, 745–750.
- Leary, C., Leese, H.J., and Sturme, R.G. (2015). Human embryos from overweight and obese women display phenotypic and metabolic abnormalities. *Hum. Reprod.* *30*, 122–132.
- Leddy, M.A., Power, M.L., and Schulkin, J. (2008). The Impact of Maternal Obesity on Maternal and Fetal Health. *Rev. Obstet. Gynecol.* *1*, 170–178.
- Lee, D.K., Cheng, R., Nguyen, T., Fan, T., Kariyawasam, A.P., Liu, Y., Osmond, D.H., George, S.R., and O'Dowd, B.F. (2000). Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor. *J. Neurochem.* *74*, 34–41.
- Lee, F.Y., Li, Y., Yang, E.K., Yang, S.Q., Lin, H.Z., Trush, M.A., Dannenberg, A.J., and Diehl, A.M. (1999). Phenotypic abnormalities in macrophages from leptin-deficient, obese mice. *Am. J. Physiol.* *276*, C386-394.
- Lee, M.K.S., Yvan-Charvet, L., Masters, S.L., and Murphy, A.J. (2016). The modern interleukin-1 superfamily: Divergent roles in obesity. *Semin. Immunol.* *28*, 441–449.
- Lee, S., Lee, H.-C., Kwon, Y.-W., Lee, S.E., Cho, Y., Kim, J., Lee, S., Kim, J.-Y., Lee, J., Yang, H.-M., et al. (2014). Adenylyl cyclase-associated protein 1 is a receptor for human resistin and mediates inflammatory actions of human monocytes. *Cell Metab.* *19*, 484–497.

- Lee, Y., Yu, X., Gonzales, F., Mangelsdorf, D.J., Wang, M.-Y., Richardson, C., Witters, L.A., and Unger, R.H. (2002). PPAR α is necessary for the lipopenic action of hyperleptinemia on white adipose and liver tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 11848–11853.
- Leguy, M.C., Brun, S., Pidoux, G., Salhi, H., Choiset, A., Menet, M.C., Gil, S., Tsatsaris, V., and Guibourdenche, J. (2014). Pattern of secretion of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) during pregnancies complicated by fetal aneuploidy, in vivo and in vitro. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* *12*, 129.
- Levitz, M., and Young, B.K. (1978). Estrogens in Pregnancy. In *Vitamins & Hormones*, P.L. Munson, E. Diczfalusy, J. Glover, and R.E. Olson, eds. (Academic Press), pp. 109–147.
- Lewis, R.M., Glazier, J., Greenwood, S.L., Bennett, E.J., Godfrey, K.M., Jackson, A.A., Sibley, C.P., Cameron, I.T., and Hanson, M.A. (2007). L-serine uptake by human placental microvillous membrane vesicles. *Placenta* *28*, 445–452.
- Li, W., Olofsson, J.I., Jeung, E.-B., Krisinger, J., Ho Yuen, B., and Leung, P.C.K. (1994). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and cyclic amp positively regulate inhibin subunit messenger RNA levels in human placental cells. *Life Sci.* *55*, 1717–1724.
- Li, Y., Xu, S., Mihaylova, M.M., Zheng, B., Hou, X., Jiang, B., Park, O., Luo, Z., Lefai, E., Shyy, J.Y.-J., et al. (2011). AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell Metab.* *13*, 376–388.
- Lim, W.F., Inoue-Yokoo, T., Tan, K.S., Lai, M.I., and Sugiyama, D. (2013). Hematopoietic cell differentiation from embryonic and induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* *4*, 71.
- Lin, T.M., Galbert, S.P., Kiefer, D., Spellacy, W.N., and Gall, S. (1974). Characterization of four human pregnancy-associated plasma proteins. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *118*, 223–236.
- Lindgaard, M.L.S., Damm, P., Mathiesen, E.R., and Nielsen, L.B. (2006). Placental triglyceride accumulation in maternal type 1 diabetes is associated with increased lipase gene expression. *J. Lipid Res.* *47*, 2581–2588.
- Linnemann, K., Malek, A., Sager, R., Blum, W.F., Schneider, H., and Fusch, C. (2000). Leptin production and release in the dually in vitro perfused human placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *85*, 4298–4301.
- Liu, M., and Liu, F. (2010). Transcriptional and post-translational regulation of adiponectin. *Biochem. J.* *425*, 41–52.
- Liu, J., Divoux, A., Sun, J., Zhang, J., Clément, K., Glickman, J.N., Sukhova, G.K., Wolters, P.J., Du, J., Gorgun, C.Z., et al. (2009). Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. *Nat. Med.* *15*, 940–945.
- Liu, Z., Xiao, T., Peng, X., Li, G., and Hu, F. (2017). APPLs: More than just adiponectin receptor binding proteins. *Cell. Signal.* *32*, 76–84.
- Loardi, C., Falchetti, M., Prefumo, F., Facchetti, F., and Frusca, T. (2016). Placental morphology in pregnancies associated with pregravid obesity. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* *29*, 2611–2616.
- Lobo, J.O., and Bellino, F.L. (1989). Estrogen synthetase (aromatase) activity in primary culture of human term placental cells: effects of cell preparation, growth medium, and serum on adenosine 3',5'-monophosphate response. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *69*, 868–874.
- Loffreda, S., Yang, S.Q., Lin, H.Z., Karp, C.L., Brengman, M.L., Wang, D.J., Klein, A.S., Bulkley, G.B., Bao, C., Noble, P.W., et al. (1998). Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *12*, 57–65.
- Loh, K., Fukushima, A., Zhang, X., Galic, S., Briggs, D., Enriori, P.J., Simonds, S., Wiede, F., Reichenbach, A., Hauser, C., et al. (2011). Elevated hypothalamic TCPTP in obesity contributes to cellular leptin resistance. *Cell Metab.* *14*, 684–699.
- Lowman, H.B., Cunningham, B.C., and Wells, J.A. (1991). Mutational analysis and protein engineering of receptor-binding determinants in human placental lactogen. *J. Biol. Chem.* *266*, 10982–10988.
- Lu, M., Tang, Q., Olefsky, J.M., Mellon, P.L., and Webster, N.J.G. (2008). Adiponectin activates adenosine monophosphate-activated protein kinase and decreases luteinizing hormone secretion in L β T2 gonadotropes. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *22*, 760–771.
- Lunghi, L., Ferretti, M.E., Medici, S., Biondi, C., and Vesce, F. (2007). Control of human trophoblast function. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* *5*, 6.
- Luo, L., and Liu, M. (2016). Adipose tissue in control of metabolism. *J. Endocrinol.* *231*, R77–R99.

- Luzzo, K.M., Wang, Q., Purcell, S.H., Chi, M., Jimenez, P.T., Grindler, N., Schedl, T., and Moley, K.H. (2012). High Fat Diet Induced Developmental Defects in the Mouse: Oocyte Meiotic Aneuploidy and Fetal Growth Retardation/Brain Defects. *PLOS ONE* 7, e49217.
- Ma, Y., Zhu, M.J., Zhang, L., Hein, S.M., Nathanielsz, P.W., and Ford, S.P. (2010). Maternal obesity and overnutrition alter fetal growth rate and cotyledonary vascularity and angiogenic factor expression in the ewe. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 299, R249–R258.
- Machinal-Quélin, F., Dieudonné, M.-N., Pecquery, R., Leneveu, M.-C., and Giudicelli, Y. (2002). Direct in vitro effects of androgens and estrogens on ob gene expression and leptin secretion in human adipose tissue. *Endocrine* 18, 179–184.
- Machtinger, R., Combelles, C.M.H., Missmer, S.A., Correia, K.F., Fox, J.H., and Racowsky, C. (2012). The association between severe obesity and characteristics of failed fertilized oocytes. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 27, 3198–3207.
- Mackenzie, B., and Erickson, J.D. (2004). Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family. *Pflugers Arch.* 447, 784–795.
- MacKenzie, K.F., Clark, K., Naqvi, S., McGuire, V.A., Nöehren, G., Kristariyanto, Y., van den Bosch, M., Mudaliar, M., McCarthy, P.C., Pattison, M.J., et al. (2013). PGE(2) induces macrophage IL-10 production and a regulatory-like phenotype via a protein kinase A-SIK-CRTC3 pathway. *J. Immunol. Baltim. Md* 190, 565–577.
- Maeda, K., Okubo, K., Shimomura, I., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., and Matsubara, K. (1996). cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 221, 286–289.
- Magariños, M.P., Sánchez-Margalet, V., Kotler, M., Calvo, J.C., and Varone, C.L. (2007). Leptin Promotes Cell Proliferation and Survival of Trophoblastic Cells. *Biol. Reprod.* 76, 203–210.
- Magnusson-Olsson, A.L., Lager, S., Jacobsson, B., Jansson, T., and Powell, T.L. (2007). Effect of maternal triglycerides and free fatty acids on placental LPL in cultured primary trophoblast cells and in a case of maternal LPL deficiency. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 293, E24–E30.
- Maher, F., and Harrison, L.C. (1990). Stabilization of glucose transporter mRNA by insulin/IGF-1 and glucose deprivation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171, 210–215.
- Makki, K., Froguel, P., and Wolowczuk, I. (2013). Adipose Tissue in Obesity-Related Inflammation and Insulin Resistance: Cells, Cytokines, and Chemokines.
- Malik, V.S., Willett, W.C., and Hu, F.B. (2013). Global obesity: trends, risk factors and policy implications. *Nat. Rev. Endocrinol.* 9, 13–27.
- Malti, N., Merzouk, H., Merzouk, S.A., Loukidi, B., Karaouzene, N., Malti, A., and Narce, M. (2014). Oxidative stress and maternal obesity: Feto-placental unit interaction. *Placenta* 35, 411–416.
- Mantovani, A., Cassatella, M.A., Costantini, C., and Jaillon, S. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 519–531.
- Manuelpillai, U., Schneider-Kolsky, M., Thirunavukarasu, P., Dole, A., Waldron, K., and Wallace, E.M. (2003). Effect of Hypoxia on Placental Activin A, Inhibin A and Follistatin Synthesis. *Placenta* 24, 77–83.
- Mao, X., Kikani, C.K., Riojas, R.A., Langlais, P., Wang, L., Ramos, F.J., Fang, Q., Christ-Roberts, C.Y., Hong, J.Y., Kim, R.-Y., et al. (2006). APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling and function. *Nat. Cell Biol.* 8, 516–523.
- Martín-Romero, C., Santos-Alvarez, J., Goberna, R., and Sánchez-Margalet, V. (2000). Human leptin enhances activation and proliferation of human circulating T lymphocytes. *Cell. Immunol.* 199, 15–24.
- Mason, M.M., He, Y., Chen, H., Quon, M.J., and Reitman, M. (1998). Regulation of leptin promoter function by Sp1, C/EBP, and a novel factor. *Endocrinology* 139, 1013–1022.
- Masouyé, I., Hagens, G., Van Kuppevelt, T.H., Madsen, P., Saurat, J.H., Veerkamp, J.H., Pepper, M.S., and Siegenthaler, G. (1997). Endothelial cells of the human microvasculature express epidermal fatty acid-binding protein. *Circ. Res.* 81, 297–303.
- Masri, B., Dray, C., Knauf, C., Valet, P., and Castan-Laurell, I. (2015). Le récepteur de l'apeline - Une voie originale dans la stratégie antidiabétique. *médecine/sciences* 31, 275–281.
- Masuzaki, H., Ogawa, Y., Sagawa, N., Hosoda, K., Matsumoto, T., Mise, H., Nishimura, H., Yoshimasa, Y., Tanaka, I., Mori, T., et al. (1997). Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat. Med.* 3, 1029–1033.

- Matarese, G., Moschos, S., and Mantzoros, C.S. (2005). Leptin in immunology. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 *174*, 3137–3142.
- Mattioli, B., Giordani, L., Quaranta, M.G., and Viora, M. (2009). Leptin exerts an anti-apoptotic effect on human dendritic cells via the PI3K-Akt signaling pathway. *FEBS Lett.* *583*, 1102–1106.
- Mayeur, S., Watzet, J.-S., Lukaszewski, M.-A., Lecoutre, S., Butruille, L., Drougard, A., Eberlé, D., Bastide, B., Laborie, C., Storme, L., et al. (2016). Apelin Controls Fetal and Neonatal Glucose Homeostasis and Is Altered by Maternal Undernutrition. *Diabetes* *65*, 554–560.
- Maymó, J.L., Pérez Pérez, A., Sánchez-Margalet, V., Dueñas, J.L., Calvo, J.C., and Varone, C.L. (2009). Up-regulation of placental leptin by human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* *150*, 304–313.
- Maymó, J.L., Pérez Pérez, A., Gambino, Y., Calvo, J.C., Sánchez-Margalet, V., and Varone, C.L. (2011). Review: Leptin gene expression in the placenta – Regulation of a key hormone in trophoblast proliferation and survival. *Placenta* *32, Supplement 2*, S146–S153.
- Mayr, B.M., Canettieri, G., and Montminy, M.R. (2001). Distinct effects of cAMP and mitogenic signals on CREB-binding protein recruitment impart specificity to target gene activation via CREB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 10936–10941.
- Mazaki-Tovi, S., Romero, R., Kusanovic, J.P., Erez, O., Vaisbuch, E., Gotsch, F., Mittal, P., Than, G.N., Nhan-Chang, C., Chaiworapongsa, T., et al. (2008). Adiponectin multimers in maternal plasma. *J. Matern.-Fetal Neonatal Med. Off. J. Eur. Assoc. Perinat. Med. Fed. Asia Ocean. Perinat. Soc. Int. Soc. Perinat. Obstet.* *21*, 796–815.
- McCluggage, W.G., Ashe, P., McBride, H., Maxwell, P., and Sloan, J.M. (1998). Localization of the cellular expression of inhibin in trophoblastic tissue. *Histopathology* *32*, 252–256.
- McDonald, E.A., and Wolfe, M.W. (2009). Adiponectin Attenuation of Endocrine Function within Human Term Trophoblast Cells. *Endocrinology* *150*, 4358–4365.
- McDonald, E.A., and Wolfe, M.W. (2011). The pro-inflammatory role of adiponectin at the maternal-fetal interface. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N* 1989 *66*, 128–136.
- McGee, E.A., and Hsueh, A.J. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr. Rev.* *21*, 200–214.
- Medhurst, A.D., Jennings, C.A., Robbins, M.J., Davis, R.P., Ellis, C., Winborn, K.Y., Lawrie, K.W.M., Hervieu, G., Riley, G., Bolaky, J.E., et al. (2003). Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin. *J. Neurochem.* *84*, 1162–1172.
- Mele, J., Muralimanoharan, S., Maloyan, A., and Myatt, L. (2014). Impaired mitochondrial function in human placenta with increased maternal adiposity. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* *307*, E419–E425.
- Mellman, I. (2013). Dendritic cells: master regulators of the immune response. *Cancer Immunol. Res.* *1*, 145–149.
- Metwally, M., Cutting, R., Tipton, A., Skull, J., Ledger, W., and Li, T. (2007). Effect of increased body mass index on oocyte and embryo quality in IVF patients. *Reprod. Biomed. Online* *15*, 532–538.
- Metwally, M., Preece, R., Thomas, J., Ledger, W., and Li, T.C. (2014). A proteomic analysis of the endometrium in obese and overweight women with recurrent miscarriage: preliminary evidence for an endometrial defect. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* *12*, 75.
- Michalakis, K., Mintziori, G., Kaprara, A., Tarlatzis, B.C., and Goulis, D.G. (2013). The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: A narrative review. *Metabolism* *62*, 457–478.
- Michel, C.C., and Neal, C.R. (1999). Openings through endothelial cells associated with increased microvascular permeability. *Microcirc. N. Y. N* 1994 *6*, 45–54.
- Mihaylova, M.M., and Shaw, R.J. (2011). The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat. Cell Biol.* *13*, 1016–1023.
- Minokoshi, Y., Kim, Y.-B., Peroni, O.D., Fryer, L.G.D., Müller, C., Carling, D., and Kahn, B.B. (2002). Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* *415*, 339–343.
- Mishima, T., Miner, J.H., Morizane, M., Stahl, A., and Sadovsky, Y. (2011). The Expression and Function of Fatty Acid Transport Protein-2 and -4 in the Murine Placenta. *PLoS ONE* *6*.
- Mitanchez, D., Jacqueminet, S., Nizard, J., Tanguy, M.-L., Ciangura, C., Lacorte, J.-M., De Carne, C., Foix L'Hélias, L., Chavatte-Palmer, P., Charles, M.-A., et al. (2017). Effect of maternal obesity on birthweight and neonatal fat mass: A prospective clinical trial. *PLoS ONE* *12*.

- Mitsuya, K., Parker, A.N., Liu, L., Ruan, J., Vissers, M.C.M., and Myatt, L. (2017). Alterations in the placental methylome with maternal obesity and evidence for metabolic regulation. *PLOS ONE* 12, e0186115.
- Miyazaki, S., Tsuda, H., Sakai, M., Hori, S., Sasaki, Y., Futatani, T., Miyawaki, T., and Saito, S. (2003). Predominance of Th2-promoting dendritic cells in early human pregnancy decidua. *J. Leukoc. Biol.* 74, 514–522.
- Moffett, A., and Colucci, F. (2014). Uterine NK cells: active regulators at the maternal-fetal interface. *J. Clin. Invest.* 124, 1872–1879.
- Moffett, A., and Loke, C. (2006). Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 584–594.
- Mokdad, A.H., Serdula, M.K., Dietz, W.H., Bowman, B.A., Marks, J.S., and Koplan, J.P. (1999). The spread of the obesity epidemic in the United States, 1991-1998. *JAMA* 282, 1519–1522.
- Mokdad, A.H., Ford, E.S., Bowman, B.A., Dietz, W.H., Vinicor, F., Bales, V.S., and Marks, J.S. (2003). Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. *JAMA* 289, 76–79.
- Monteiro, R., and Azevedo, I. (2010). Chronic Inflammation in Obesity and the Metabolic Syndrome. *Mediators Inflamm.* 2010.
- Moon, H.-S., Dincer, F., and Mantzoros, C.S. (2013). Amylin-induced downregulation of hippocampal neurogenesis is attenuated by leptin in a STAT3/AMPK/ERK-dependent manner in mice. *Diabetologia* 56, 627–634.
- Moore, L.G., Charles, S.M., and Julian, C.G. (2011). Humans at high altitude: hypoxia and fetal growth. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 178, 181–190.
- Moreno-Aliaga, M.J., Stanhope, K.L., and Havel, P.J. (2001). Transcriptional regulation of the leptin promoter by insulin-stimulated glucose metabolism in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283, 544–548.
- Mori, H., Hanada, R., Hanada, T., Aki, D., Mashima, R., Nishinakamura, H., Torisu, T., Chien, K.R., Yasukawa, H., and Yoshimura, A. (2004). Socs3 deficiency in the brain elevates leptin sensitivity and confers resistance to diet-induced obesity. *Nat. Med.* 10, 739–743.
- Mori, M., Ishikawa, G., Luo, S.-S., Mishima, T., Goto, T., Robinson, J.M., Matsubara, S., Takeshita, T., Kataoka, H., and Takizawa, T. (2007). The cytotrophoblast layer of human chorionic villi becomes thinner but maintains its structural integrity during gestation. *Biol. Reprod.* 76, 164–172.
- Morrison, C.D., Daniel, J.A., Holmberg, B.J., Djiane, J., Raver, N., Gertler, A., and Keisler, D.H. (2001). Central infusion of leptin into well-fed and undernourished ewe lambs: effects on feed intake and serum concentrations of growth hormone and luteinizing hormone. *J. Endocrinol.* 168, 317–324.
- Morrison, C.D., White, C.L., Wang, Z., Lee, S.-Y., Lawrence, D.S., Cefalu, W.T., Zhang, Z.-Y., and Gettys, T.W. (2007). Increased hypothalamic protein tyrosine phosphatase 1B contributes to leptin resistance with age. *Endocrinology* 148, 433–440.
- Morton, N.M., Emilsson, V., Liu, Y.-L., and Cawthorne, M.A. (1998). Leptin Action in Intestinal Cells. *J. Biol. Chem.* 273, 26194–26201.
- Moschen, A.R., Kaser, A., Enrich, B., Mosheimer, B., Theurl, M., Niederegger, H., and Tilg, H. (2007). Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 178, 1748–1758.
- Moschos, S., Chan, J.L., and Mantzoros, C.S. (2002). Leptin and reproduction: a review. *Fertil. Steril.* 77, 433–444.
- Mousiolis, A.V., Kollia, P., Skentou, C., and Messinis, I.E. (2012). Effects of leptin on the expression of fatty acid-binding proteins in human placental cell cultures. *Mol. Med. Rep.* 5, 497–502.
- Mulligan, K., Khatami, H., Schwarz, J.-M., Sakkas, G.K., DePaoli, A.M., Tai, V.W., Wen, M.J., Lee, G.A., Grunfeld, C., and Schambelan, M. (2009). The effects of recombinant human leptin on visceral fat, dyslipidemia, and insulin resistance in patients with human immunodeficiency virus-associated lipodystrophy and hypoleptinemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 1137–1144.
- Münzberg, H., and Morrison, C.D. (2015). Structure, production and signaling of leptin. *Metabolism.* 64, 13–23.
- Muruganandan, S., Parlee, S.D., Rourke, J.L., Ernst, M.C., Goralski, K.B., and Sinal, C.J. (2011). Chemerin, a novel peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) target gene that promotes mesenchymal stem cell adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 286, 23982–23995.
- Myatt, L., and Cui, X. (2004). Oxidative stress in the placenta. *Histochem. Cell Biol.* 122, 369–382.
- Myers, M.G., Cowley, M.A., and Münzberg, H. (2008). Mechanisms of Leptin Action and Leptin Resistance. *Annu. Rev. Physiol.* 70, 537–556.

- Nakano, Y., Tobe, T., Choi-Miura, N.H., Mazda, T., and Tomita, M. (1996). Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J. Biochem. (Tokyo)* *120*, 803–812.
- Napoleone, E., Di Santo, A., Amore, C., Baccante, G., di Febbo, C., Porreca, E., de Gaetano, G., Donati, M.B., and Lorenzet, R. (2007). Leptin induces tissue factor expression in human peripheral blood mononuclear cells: a possible link between obesity and cardiovascular risk? *J. Thromb. Haemost. JTH* *5*, 1462–1468.
- Nawrocki, A.R., Rajala, M.W., Tomas, E., Pajvani, U.B., Saha, A.K., Trumbauer, M.E., Pang, Z., Chen, A.S., Ruderman, N.B., Chen, H., et al. (2006). Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J. Biol. Chem.* *281*, 2654–2660.
- Nelson, D.M., Smith, S.D., Furesz, T.C., Sadovsky, Y., Ganapathy, V., Parvin, C.A., and Smith, C.H. (2003). Hypoxia reduces expression and function of system A amino acid transporters in cultured term human trophoblasts. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *284*, C310–315.
- Nestler, J.E. (1989). Insulin and insulin-like growth factor-I stimulate the 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity of human placental cytotrophoblasts. *Endocrinology* *125*, 2127–2133.
- Nguyen, M.T.A., Favelyukis, S., Nguyen, A.-K., Reichart, D., Scott, P.A., Jenn, A., Liu-Bryan, R., Glass, C.K., Neels, J.G., and Olefsky, J.M. (2007). A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J. Biol. Chem.* *282*, 35279–35292.
- Nielsen, A.H., Schauser, K.H., and Poulsen, K. (2000). Current topic: the uteroplacental renin-angiotensin system. *Placenta* *21*, 468–477.
- Nigro, E., Scudiero, O., Sarnataro, D., Mazzarella, G., Sofia, M., Bianco, A., and Daniele, A. (2013). Adiponectin affects lung epithelial A549 cell viability counteracting TNF α and IL-1 β toxicity through AdipoR1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *45*, 1145–1153.
- Nijhuis, J., Rensen, S.S., Slaats, Y., Dielen, F.M.H. van, Buurman, W.A., and Greve, J.W.M. (2009). Neutrophil Activation in Morbid Obesity, Chronic Activation of Acute Inflammation. *Obesity* *17*, 2014–2018.
- Nilsson, L., Binart, N., Bohlooly-Y, M., Bramnert, M., Egecioglu, E., Kindblom, J., Kelly, P.A., Kopchick, J.J., Ormandy, C.J., Ling, C., et al. (2005). Prolactin and growth hormone regulate adiponectin secretion and receptor expression in adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *331*, 1120–1126.
- Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Eto, K., Yamashita, H., Ohsugi, M., Otsu, M., Hara, K., Ueki, K., Sugiura, S., et al. (2009). CD8 $^+$ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat. Med.* *15*, 914–920.
- Nishizawa, H., Shimomura, I., Kishida, K., Maeda, N., Kuriyama, H., Nagaretani, H., Matsuda, M., Kondo, H., Furuyama, N., Kihara, S., et al. (2002). Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. *Diabetes* *51*, 2734–2741.
- Nomura, Y., Lambertini, L., Rialdi, A., Lee, M., Mystal, E.Y., Grabie, M., Manaster, I., Huynh, N., Finik, J., Davey, M., et al. (2014). Global Methylation in the Placenta and Umbilical Cord Blood From Pregnancies With Maternal Gestational Diabetes, Preeclampsia, and Obesity. *Reprod. Sci.* *21*, 131–137.
- Nwabuobi, C., Arlier, S., Schatz, F., Guzeloglu-Kayisli, O., Lockwood, C.J., and Kayisli, U.A. (2017). hCG: Biological Functions and Clinical Applications. *Int. J. Mol. Sci.* *18*.
- Oakley, N.W., Beard, R.W., and Turner, R.C. (1972). Effect of sustained maternal hyperglycaemia on the fetus in normal and diabetic pregnancies. *Br. Med. J.* *1*, 466–469.
- O'Dowd, B.F., Heiber, M., Chan, A., Heng, H.H., Tsui, L.C., Kennedy, J.L., Shi, X., Petronis, A., George, S.R., and Nguyen, T. (1993). A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene* *136*, 355–360.
- Oestreich, K.J., and Weinmann, A.S. (2012). Master regulators or lineage-specifying? Changing views on CD4 $^+$ T cell transcription factors. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 799–804.
- Okamoto, Y., Arita, Y., Nishida, M., Muraguchi, M., Ouchi, N., Takahashi, M., Igura, T., Inui, Y., Kihara, S., Nakamura, T., et al. (2000). An adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, adheres to injured vascular walls. *Horm. Metab. Res. Horm. Stoffwechselforschung Horm. Metab.* *32*, 47–50.
- Ono, K., and Han, J. (2000). The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell. Signal.* *12*, 1–13.
- Oral, E.A., Ruiz, E., Andewelt, A., Sebring, N., Wagner, A.J., Depaoli, A.M., and Gorden, P. (2002). Effect of leptin replacement on pituitary hormone regulation in patients with severe lipodystrophy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *87*, 3110–3117.

- Orendi, K., Gauster, M., Moser, G., Meiri, H., and Huppertz, B. (2010). The choriocarcinoma cell line BeWo: syncytial fusion and expression of syncytium-specific proteins. *Reprod. Camb. Engl.* *140*, 759–766.
- Otero, M., Lago, R., Lago, F., Casanueva, F.F., Dieguez, C., Gómez-Reino, J.J., and Gualillo, O. (2005). Leptin, from fat to inflammation: old questions and new insights. *FEBS Lett.* *579*, 295–301.
- Ottonello, L., Gnerre, P., Bertolotto, M., Mancini, M., Dapino, P., Russo, R., Garibotto, G., Barreca, T., and Dallegri, F. (2004). Leptin as a uremic toxin interferes with neutrophil chemotaxis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *15*, 2366–2372.
- Ouchi, N., and Walsh, K. (2007). Adiponectin as an anti-inflammatory factor. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* *380*, 24–30.
- Ouchi, N., Kihara, S., Arita, Y., Maeda, K., Kuriyama, H., Okamoto, Y., Hotta, K., Nishida, M., Takahashi, M., Nakamura, T., et al. (1999). Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* *100*, 2473–2476.
- Ouchi, N., Kihara, S., Arita, Y., Nishida, M., Matsuyama, A., Okamoto, Y., Ishigami, M., Kuriyama, H., Kishida, K., Nishizawa, H., et al. (2001). Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation* *103*, 1057–1063.
- Ouchi, N., Kihara, S., Funahashi, T., Nakamura, T., Nishida, M., Kumada, M., Okamoto, Y., Ohashi, K., Nagaretani, H., Kishida, K., et al. (2003). Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue. *Circulation* *107*, 671–674.
- Ouchi, N., Kobayashi, H., Kihara, S., Kumada, M., Sato, K., Inoue, T., Funahashi, T., and Walsh, K. (2004). Adiponectin stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* *279*, 1304–1309.
- Oviedo, P.J., Sobrino, A., Laguna-Fernandez, A., Novella, S., Tarín, J.J., García-Pérez, M.-A., Sanchís, J., Cano, A., and Hermenegildo, C. (2011). Estradiol induces endothelial cell migration and proliferation through estrogen receptor-enhanced RhoA/ROCK pathway. *Mol. Cell. Endocrinol.* *335*, 96–103.
- Oxvig, C. (2015). The role of PAPP-A in the IGF system: location, location, location. *J. Cell Commun. Signal.* *9*, 177–187.
- Pala, H.G., Ozalp, Y., Yener, A.S., Gerçeklioglu, G., Uysal, S., and Onvural, A. (2015). Adiponectin levels in gestational diabetes mellitus and in pregnant women without glucose intolerance. *Adv. Clin. Exp. Med. Off. Organ Wroclaw Med. Univ.* *24*, 85–92.
- Palacín, M., Estévez, R., Bertran, J., and Zorzano, A. (1998). Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol. Rev.* *78*, 969–1054.
- Palou, M., Picó, C., McKay, J.A., Sánchez, J., Priego, T., Mathers, J.C., and Palou, A. (2011). Protective effects of leptin during the suckling period against later obesity may be associated with changes in promoter methylation of the hypothalamic pro-opiomelanocortin gene. *Br. J. Nutr.* *106*, 769–778.
- Pantham, P., Aye, I.L.M.H., and Powell, T.L. (2015). Inflammation in Maternal Obesity and Gestational Diabetes Mellitus. *Placenta* *36*, 709–715.
- Pasquali, R., Pelusi, C., Genghini, S., Cacciari, M., and Gambineri, A. (2003). Obesity and reproductive disorders in women. *Hum. Reprod. Update* *9*, 359–372.
- Patel, S.D., Rajala, M.W., Rossetti, L., Scherer, P.E., and Shapiro, L. (2004). Disulfide-dependent multimeric assembly of resistin family hormones. *Science* *304*, 1154–1158.
- Peelman, F., Zabeau, L., Moharana, K., Savvides, S.N., and Tavernier, J. (2014). 20 years of leptin: insights into signaling assemblies of the leptin receptor. *J. Endocrinol.* *223*, T9-23.
- Pénicaud, L., Meillon, S., and Brondel, L. (2012). Leptin and the central control of feeding behavior. *Biochimie* *94*, 2069–2074.
- Peralta, S., Carrascosa, J.M., Gallardo, N., Ros, M., and Arribas, C. (2002). Ageing increases SOCS-3 expression in rat hypothalamus: effects of food restriction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *296*, 425–428.
- Pérez-Pérez, A., Maymó, J., Dueñas, J.L., Goberna, R., Calvo, J.C., Varone, C., and Sánchez-Margalet, V. (2008). Leptin prevents apoptosis of trophoblastic cells by activation of MAPK pathway. *Arch. Biochem. Biophys.* *477*, 390–395.
- Pérez-Pérez, A., Gambino, Y., Maymó, J., Goberna, R., Fabiani, F., Varone, C., and Sánchez-Margalet, V. (2010). MAPK and PI3K activities are required for leptin stimulation of protein synthesis in human trophoblastic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *396*, 956–960.

- Pérez-Pérez, A., Maymó, J., Gambino, Y., Guadix, P., Dueñas, J.L., Varone, C., and Sánchez-Margalet, V. (2013). Insulin enhances leptin expression in human trophoblastic cells. *Biol. Reprod.* *89*, 20.
- Pérez-Pérez, A., Toro, A.R., Vilarino-Garcia, T., Guadix, P., Maymó, J.L., Dueñas, J.L., Varone, C.L., and Sánchez-Margalet, V. (2016). Leptin reduces apoptosis triggered by high temperature in human placental villous explants: The role of the p53 pathway. *Placenta* *42*, 106–113.
- Petraglia, F. (1997). Inhibin, activin and follistatin in the human placenta—a new family of regulatory proteins. *Placenta* *18*, 3–8.
- Petraglia, F., Vaughan, J., and Vale, W. (1989). Inhibin and activin modulate the release of gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin, and progesterone from cultured human placental cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 5114–5117.
- Phay, J.E., Hussain, H.B., and Moley, J.F. (2000). Cloning and expression analysis of a novel member of the facilitative glucose transporter family, SLC2A9 (GLUT9). *Genomics* *66*, 217–220.
- Pidoux, G., Gerbaud, P., Tsatsaris, V., Marpeau, O., Ferreira, F., Meduri, G., Guibourdenche, J., Badet, J., Evain-Brion, D., and Frenco, J.-L. (2007). Biochemical characterization and modulation of LH/CG-receptor during human trophoblast differentiation. *J. Cell. Physiol.* *212*, 26–35.
- Pidoux, G., Gerbaud, P., Gnidehou, S., Grynberg, M., Geneau, G., Guibourdenche, J., Carette, D., Cronier, L., Evain-Brion, D., Malassiné, A., et al. (2010). ZO-1 is involved in trophoblastic cell differentiation in human placenta. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *298*, C1517-1526.
- Pierre, P., Froment, P., Nègre, D., Ramé, C., Barateau, V., Chabrolle, C., Lecomte, P., and Dupont, J. (2009). Role of adiponectin receptors, AdipoR1 and AdipoR2, in the steroidogenesis of the human granulosa tumor cell line, KGN. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *24*, 2890–2901.
- Poidatz, D., Dos Santos, E., Brulé, A., De Mazancourt, P., and Dieudonné, M.N. (2012). Estrogen-related receptor gamma modulates energy metabolism target genes in human trophoblast. *Placenta* *33*, 688–695.
- Poidatz, D., Dos Santos, E., Duval, F., Moindjie, H., Serazin, V., Vialard, F., De Mazancourt, P., and Dieudonné, M.-N. (2015). Involvement of estrogen-related receptor- γ and mitochondrial content in intrauterine growth restriction and preeclampsia. *Fertil. Steril.* *104*, 483–490.
- Policastro, P.F., Daniels-McQueen, S., Carle, G., and Boime, I. (1986). A map of the hCG beta-LH beta gene cluster. *J. Biol. Chem.* *261*, 5907–5916.
- Poretsky, L., Cataldo, N.A., Rosenwaks, Z., and Giudice, L.C. (1999). The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. *Endocr. Rev.* *20*, 535–582.
- Porter, S.A., Massaro, J.M., Hoffmann, U., Vasan, R.S., O'Donnel, C.J., and Fox, C.S. (2009). Abdominal subcutaneous adipose tissue: a protective fat depot? *Diabetes Care* *32*, 1068–1075.
- Preston, A.M., Lindsay, L.A., and Murphy, C.R. (2006). Desmosomes in uterine epithelial cells decrease at the time of implantation: an ultrastructural and morphometric study. *J. Morphol.* *267*, 103–108.
- Prieur, X., Mok, C.Y.L., Velagapudi, V.R., Núñez, V., Fuentes, L., Montaner, D., Ishikawa, K., Camacho, A., Barbarroja, N., O'Rahilly, S., et al. (2011). Differential lipid partitioning between adipocytes and tissue macrophages modulates macrophage lipotoxicity and M2/M1 polarization in obese mice. *Diabetes* *60*, 797–809.
- Procaccini, C., Galgani, M., De Rosa, V., Carbone, F., La Rocca, C., Ranucci, G., Iorio, R., and Matarese, G. (2010). Leptin: the prototypic adipocytokine and its role in NAFLD. *Curr. Pharm. Des.* *16*, 1902–1912.
- Prolo, P., Wong, M.L., and Licinio, J. (1998). Leptin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *30*, 1285–1290.
- Pucino, V., De Rosa, V., Procaccini, C., and Matarese, G. (2014). Regulatory T cells, leptin and angiogenesis. *Chem. Immunol. Allergy* *99*, 155–169.
- Qiao, L., Kinney, B., Yoo, H.S., Lee, B., Schaack, J., and Shao, J. (2012). Adiponectin increases skeletal muscle mitochondrial biogenesis by suppressing mitogen-activated protein kinase phosphatase-1. *Diabetes* *61*, 1463–1470.
- Qu, J., and Thomas, K. (1993). Prostaglandins stimulate the secretion of inhibin from human placental cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *77*, 556–564.
- Raghupathy, R., Al Mutawa, E., Makhseed, M., Azizieh, F., and Szekeres-Bartho, J. (2005). Modulation of cytokine production by dydrogesterone in lymphocytes from women with recurrent miscarriage. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* *112*, 1096–1101.

- Rahmouni, K., Fath, M.A., Seo, S., Thedens, D.R., Berry, C.J., Weiss, R., Nishimura, D.Y., and Sheffield, V.C. (2008). Leptin resistance contributes to obesity and hypertension in mouse models of Bardet-Biedl syndrome. *J. Clin. Invest.* *118*, 1458–1467.
- Ramadan, T., Camargo, S.M.R., Summa, V., Hunziker, P., Chesnov, S., Pos, K.M., and Verrey, F. (2006). Basolateral aromatic amino acid transporter TAT1 (Slc16a10) functions as an efflux pathway. *J. Cell. Physiol.* *206*, 771–779.
- Ramamoorthy, S., Del Monte, M.A., Leibach, F.H., and Ganapathy, V. (1994). Molecular identity and calmodulin-mediated regulation of the taurine transporter in a human retinal pigment epithelial cell line. *Curr. Eye Res.* *13*, 523–529.
- Ramos, M.P., Rueda, B.R., Leavis, P.C., and Gonzalez, R.R. (2005). Leptin serves as an upstream activator of an obligatory signaling cascade in the embryo-implantation process. *Endocrinology* *146*, 694–701.
- Ramsay, J.E., Ferrell, W.R., Crawford, L., Wallace, A.M., Greer, I.A., and Sattar, N. (2002). Maternal Obesity Is Associated with Dysregulation of Metabolic, Vascular, and Inflammatory Pathways. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *87*, 4231–4237.
- Ranganathan, S., Maffei, M., and Kern, P.A. (1998). Adipose tissue ob mRNA expression in humans: discordance with plasma leptin and relationship with adipose TNF α expression. *J. Lipid Res.* *39*, 724–730.
- Rausch, M.E., Weisberg, S., Vardhana, P., and Tortoriello, D.V. (2008). Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration. *Int. J. Obes.* *2005* *32*, 451–463.
- Rayner, D.V., and Trayhurn, P. (2001). Regulation of leptin production: sympathetic nervous system interactions. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* *79*, 8–20.
- Revollo, J.R., Grimm, A.A., and Imai, S. (2007). The regulation of nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis by Namp1/PBEF/visfatin in mammals. *Curr. Opin. Gastroenterol.* *23*, 164–170.
- Rhee, J.S., Saben, J.L., Mayer, A.L., Schulte, M.B., Asghar, Z., Stephens, C., Chi, M.M.-Y., and Moley, K.H. (2016). Diet-induced obesity impairs endometrial stromal cell decidualization: a potential role for impaired autophagy. *Hum. Reprod.* *31*, 1315–1326.
- Richards, J.S., Liu, Z., Kawai, T., Tabata, K., Watanabe, H., Suresh, D., Kuo, F.-T., Pisarska, M.D., and Shimada, M. (2012). Adiponectin and its receptors modulate granulosa cell and cumulus cell functions, fertility, and early embryo development in the mouse and human. *Fertil. Steril.* *98*, 471-479.e1.
- Ring, A., Le Lay, S., Pohl, J., Verkade, P., and Stremmel, W. (2006). Caveolin-1 is required for fatty acid translocase (FAT/CD36) localization and function at the plasma membrane of mouse embryonic fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* *1761*, 416–423.
- Ringström, C., Nitert, M.D., Bennet, H., Fex, M., Valet, P., Rehfeld, J.F., Friis-Hansen, L., and Wierup, N. (2010). Apelin is a novel islet peptide. *Regul. Pept.* *162*, 44–51.
- Roberts, J.M., and Escudero, C. (2012). The placenta in preeclampsia. *Pregnancy Hypertens.* *2*, 72–83.
- Roberts, K.A., Riley, S.C., Reynolds, R.M., Barr, S., Evans, M., Statham, A., Hor, K., Jabbour, H.N., Norman, J.E., and Denison, F.C. (2011a). Placental structure and inflammation in pregnancies associated with obesity. *Placenta* *32*, 247–254.
- Roberts, K.A., Riley, S.C., Reynolds, R.M., Barr, S., Evans, M., Statham, A., Hor, K., Jabbour, H.N., Norman, J.E., and Denison, F.C. (2011b). Placental structure and inflammation in pregnancies associated with obesity. *Placenta* *32*, 247–254.
- Rocha, V.Z., Folco, E.J., Sukhova, G., Shimizu, K., Gotsman, I., Vernon, A.H., and Libby, P. (2008). Interferon-gamma, a Th1 Cytokine, Regulates Fat Inflammation A Role for Adaptive Immunity in Obesity. *Circ. Res.* *103*, 467–476.
- Roche, J., Ramé, C., Reverchon, M., Mellouk, N., Cornuau, M., Guerif, F., Froment, P., and Dupont, J. (2016). Apelin (APLN) and Apelin Receptor (APLNR) in Human Ovary: Expression, Signaling, and Regulation of Steroidogenesis in Primary Human Luteinized Granulosa Cells. *Biol. Reprod.* *95*, 104.
- Rodríguez-Hernández, H., Simental-Mendía, L.E., Rodríguez-Ramírez, G., and Reyes-Romero, M.A. (2013). Obesity and Inflammation: Epidemiology, Risk Factors, and Markers of Inflammation.
- Rodríguez-Pacheco, F., Martínez-Fuentes, A.J., Tovar, S., Pinilla, L., Tena-Sempere, M., Dieguez, C., Castaño, J.P., and Malagon, M.M. (2007). Regulation of pituitary cell function by adiponectin. *Endocrinology* *148*, 401–410.
- Ronti, T., Lupattelli, G., and Mannarino, E. (2006). The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* *64*, 355–365.
- Roos, S., Jansson, N., Palmberg, I., Säljö, K., Powell, T.L., and Jansson, T. (2007). Mammalian target of rapamycin in the human placenta regulates leucine transport and is down-regulated in restricted fetal growth. *J. Physiol.* *582*, 449–459.

- Roos, S., Lagerlöf, O., Wennergren, M., Powell, T.L., and Jansson, T. (2009a). Regulation of amino acid transporters by glucose and growth factors in cultured primary human trophoblast cells is mediated by mTOR signaling. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 297, C723-731.
- Roos, S., Kanai, Y., Prasad, P.D., Powell, T.L., and Jansson, T. (2009b). Regulation of placental amino acid transporter activity by mammalian target of rapamycin. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 296, C142-150.
- Rosario, F.J., Jansson, N., Kanai, Y., Prasad, P.D., Powell, T.L., and Jansson, T. (2011). Maternal protein restriction in the rat inhibits placental insulin, mTOR, and STAT3 signaling and down-regulates placental amino acid transporters. *Endocrinology* 152, 1119–1129.
- Rosario, F.J., Schumacher, M.A., Jiang, J., Kanai, Y., Powell, T.L., and Jansson, T. (2012). 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.* 590, 1495–1509.
- Rosenow, A., Noben, J.-P., Bouwman, F.G., Mariman, E.C.M., and Renes, J. (2013). Hypoxia-mimetic effects in the secretome of human preadipocytes and adipocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1834, 2761–2771.
- Rourke, J.L., Dranse, H.J., and Sinal, C.J. (2013). Towards an integrative approach to understanding the role of chemerin in human health and disease. *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.* 14, 245–262.
- Ruan, H., and Dong, L.Q. (2016). Adiponectin signaling and function in insulin target tissues. *J. Mol. Cell Biol.* 8, 101–109.
- Rubin, D., Helwig, U., Nothnagel, M., Lemke, N., Schreiber, S., Fölsch, U.R., Döring, F., and Schrezenmeir, J. (2008). Postprandial plasma adiponectin decreases after glucose and high fat meal and is independently associated with postprandial triacylglycerols but not with -- 11388 promoter polymorphism. *Br. J. Nutr.* 99, 76–82.
- Russell, C.D., Ricci, M.R., Brodin, R.E., Magill, E., and Fried, S.K. (2001). Regulation of the leptin content of obese human adipose tissue. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280, E399-404.
- Ryu, J., Galan, A.K., Xin, X., Dong, F., Abdul-Ghani, M.A., Zhou, L., Wang, C., Li, C., Holmes, B.M., Sloane, L.B., et al. (2014). APPL1 potentiates insulin sensitivity by facilitating the binding of IRS1/2 to the insulin receptor. *Cell Rep.* 7, 1227–1238.
- Saad, M.F., Damani, S., Gingerich, R.L., Riad-Gabriel, M.G., Khan, A., Boyadjian, R., Jinagouda, S.D., el-Tawil, K., Rude, R.K., and Kamdar, V. (1997). Sexual dimorphism in plasma leptin concentration. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 579–584.
- Saben, J., Lindsey, F., Zhong, Y., Thakali, K., Badger, T.M., Andres, A., Gomez-Acevedo, H., and Shankar, K. (2014). Maternal Obesity is Associated with a Lipotoxic Placental Environment. *Placenta* 35, 171–177.
- Sakata, M., Kurachi, H., Imai, T., Tadokoro, C., Yamaguchi, M., Yoshimoto, Y., Oka, Y., and Miyake, A. (1995). Increase in human placental glucose transporter-1 during pregnancy. *Eur. J. Endocrinol.* 132, 206–212.
- Salari, R., Wojtowicz, D., Zheng, J., Levens, D., Pilpel, Y., and Przytycka, T.M. (2012). Teasing Apart Translational and Transcriptional Components of Stochastic Variations in Eukaryotic Gene Expression. *PLOS Comput. Biol.* 8, e1002644.
- Samal, B., Sun, Y., Stearns, G., Xie, C., Suggs, S., and McNiece, I. (1994). Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Mol. Cell. Biol.* 14, 1431–1437.
- Samaras, K., Kelly, P.J., Chiano, M.N., Spector, T.D., and Campbell, L.V. (1999). Genetic and environmental influences on total-body and central abdominal fat: the effect of physical activity in female twins. *Ann. Intern. Med.* 130, 873–882.
- Sánchez-Solana, B., Laborda, J., and Baladrón, V. (2012). Mouse resistin modulates adipogenesis and glucose uptake in 3T3-L1 preadipocytes through the ROR1 receptor. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 26, 110–127.
- Sanna, V., Di Giacomo, A., La Cava, A., Lechler, R.I., Fontana, S., Zappacosta, S., and Matarese, G. (2003). Leptin surge precedes onset of autoimmune encephalomyelitis and correlates with development of pathogenic T cell responses. *J. Clin. Invest.* 111, 241–250.
- Sarabi, M.M., and Naghibalhosseini, F. (2018). The impact of polyunsaturated fatty acids on DNA methylation and expression of DNMTs in human colorectal cancer cells. *Biomed. Pharmacother. Biomedicine Pharmacother.* 101, 94–99.
- Sattar, N., Clark, P., Holmes, A., Lean, M.E., Walker, I., and Greer, I.A. (2001). Antenatal waist circumference and hypertension risk. *Obstet. Gynecol.* 97, 268–271.
- Scarpace, P.J., Matheny, M., Pollock, B.H., and Tümer, N. (1997). Leptin increases uncoupling protein expression and energy expenditure. *Am. J. Physiol.* 273, E226-230.
- Schachtrup, C., Emmler, T., Bleck, B., Sandqvist, A., and Spener, F. (2004). Functional analysis of peroxisome-proliferator-responsive element motifs in genes of fatty acid-binding proteins. *Biochem. J.* 382, 239–245.

- Schaiff, W.T., Bildirici, I., Cheong, M., Chern, P.L., Nelson, D.M., and Sadovsky, Y. (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and retinoid X receptor signaling regulate fatty acid uptake by primary human placental trophoblasts. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *90*, 4267–4275.
- Scherer, P.E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G., and Lodish, H.F. (1995). A Novel Serum Protein Similar to C1q, Produced Exclusively in Adipocytes. *J. Biol. Chem.* *270*, 26746–26749.
- Schneider, H., Möhlen, K.H., and Dancis, J. (1979). Transfer of amino acids across the in vitro perfused human placenta. *Pediatr. Res.* *13*, 236–240.
- Schneider-Kolsky, M.E., Manuelpillai, U., Waldron, K., Dole, A., and Wallace, E.M. (2002). The distribution of activin and activin receptors in gestational tissues across human pregnancy and during labour. *Placenta* *23*, 294–302.
- Schumacher, A., Brachwitz, N., Sohr, S., Engeland, K., Langwisch, S., Dolaptchieva, M., Alexander, T., Taran, A., Malfertheiner, S.F., Costa, S.-D., et al. (2009). Human chorionic gonadotropin attracts regulatory T cells into the fetal-maternal interface during early human pregnancy. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *182*, 5488–5497.
- Schwartz, M.W., Seeley, R.J., Campfield, L.A., Burn, P., and Baskin, D.G. (1996). Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J. Clin. Invest.* *98*, 1101–1106.
- Sciarrà, J.J., Sherwood, L.M., Varma, A.A., and Lundberg, W.B. (1968). Human placental lactogen (HPL) and placental weight. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *101*, 413–416.
- Segal-Lieberman, G., Bradley, R.L., Kokkotou, E., Carlson, M., Trombly, D.J., Wang, X., Bates, S., Myers, M.G., Flier, J.S., and Maratos-Flier, E. (2003). Melanin-concentrating hormone is a critical mediator of the leptin-deficient phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 10085–10090.
- Sekizawa, A., Purwosunu, Y., Yoshimura, S., Nakamura, M., Shimizu, H., Okai, T., Rizzo, N., and Farina, A. (2009). PP13 mRNA expression in trophoblasts from preeclamptic placentas. *Reprod. Sci. Thousand Oaks Calif* *16*, 408–413.
- Sell, H., Laurencikienė, J., Taube, A., Eckardt, K., Cramer, A., Horrigths, A., Arner, P., and Eckel, J. (2009). Chemerin is a novel adipocyte-derived factor inducing insulin resistance in primary human skeletal muscle cells. *Diabetes* *58*, 2731–2740.
- Senthil Kumar, S.P.D., Shen, M., Spicer, E.G., Goudjo-Ako, A.J., Stumph, J.D., Zhang, J., and Shi, H. (2014). Distinct metabolic effects following short-term exposure of different high-fat diets in male and female mice. *Endocr. J.* *61*, 457–470.
- Seo, S., Guo, D.-F., Bugge, K., Morgan, D.A., Rahmouni, K., and Sheffield, V.C. (2009). Requirement of Bardet-Biedl syndrome proteins for leptin receptor signaling. *Hum. Mol. Genet.* *18*, 1323–1331.
- Sewter, C., Berger, D., Considine, R.V., Medina, G., Rochford, J., Ciaraldi, T., Henry, R., Dohm, L., Flier, J.S., O'Rahilly, S., et al. (2002). 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* *51*, 1035–1041.
- Shafqat, S., Tamarappoo, B.K., Kilberg, M.S., Puranam, R.S., McNamara, J.O., Guadaño-Ferraz, A., and Fremeau, R.T. (1993). Cloning and expression of a novel Na(+)-dependent neutral amino acid transporter structurally related to mammalian Na+/glutamate cotransporters. *J. Biol. Chem.* *268*, 15351–15355.
- Shanker, Y.G., and Rao, A.J. (1997). Regulation of progesterone biosynthesis in the human placenta by estradiol 17 beta and progesterone. *Biochem. Mol. Biol. Int.* *43*, 591–599.
- Shapiro, L., and Scherer, P.E. (1998). The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor. *Curr. Biol. CB* *8*, 335–338.
- Shi, Q.J., Lei, Z.M., Rao, C.V., and Lin, J. (1993). Novel role of human chorionic gonadotropin in differentiation of human cytotrophoblasts. *Endocrinology* *132*, 1387–1395.
- Shibata, E., Powers, R.W., Rajakumar, A., von Versen-Höynck, F., Gallaher, M.J., Lykins, D.L., Roberts, J.M., and Hubel, C.A. (2006). Angiotensin II decreases system A amino acid transporter activity in human placental villous fragments through AT1 receptor activation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *291*, E1009-1016.
- Shin, H.-J., Oh, J., Kang, S.M., Lee, J.H., Shin, M.-J., Hwang, K.-C., Jang, Y., and Chung, J.H. (2005). Leptin induces hypertrophy via p38 mitogen-activated protein kinase in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *329*, 18–24.
- Sierra-Honigmann, M.R., Nath, A.K., Murakami, C., García-Cardeña, G., Papapetropoulos, A., Sessa, W.C., Madge, L.A., Schechner, J.S., Schwabb, M.B., Polverini, P.J., et al. (1998). Biological Action of Leptin as an Angiogenic Factor. *Science* *281*, 1683–1686.

- Silswal, N., Singh, A.K., Aruna, B., Mukhopadhyay, S., Ghosh, S., and Ehtesham, N.Z. (2005). Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-12 in macrophages by NF-kappaB-dependent pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *334*, 1092–1101.
- Song, Y., Keelan, J., and France, J.T. (1996). Activin-A stimulates, while transforming growth factor beta 1 inhibits, chorionic gonadotrophin production and aromatase activity in cultured human placental trophoblasts. *Placenta* *17*, 603–610.
- Spencer, L.A., and Weller, P.F. (2010). Eosinophils and Th2 immunity: contemporary insights. *Immunol. Cell Biol.* *88*, 250–256.
- Steele, G.L., Currie, W.D., Yuen, B.H., Jia, X.C., Perlas, E., and Leung, P.C. (1993). Acute stimulation of human chorionic gonadotropin secretion by recombinant human activin-A in first trimester human trophoblast. *Endocrinology* *133*, 297–303.
- Steppan, C.M., Bailey, S.T., Bhat, S., Brown, E.J., Banerjee, R.R., Wright, C.M., Patel, H.R., Ahima, R.S., and Lazar, M.A. (2001). The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* *409*, 307–312.
- Stienstra, R., Tack, C.J., Kanneganti, T.-D., Joosten, L.A.B., and Netea, M.G. (2012). The Inflammasome Puts Obesity in the Danger Zone. *Cell Metab.* *15*, 10–18.
- Storch, J., and McDermott, L. (2009). Structural and functional analysis of fatty acid-binding proteins. *J. Lipid Res.* *50 Suppl*, S126-131.
- St-Pierre, J., and Tremblay, M.L. (2012). Modulation of Leptin Resistance by Protein Tyrosine Phosphatases. *Cell Metab.* *15*, 292–297.
- Strain, A.J., Hill, D.J., Swenne, I., and Milner, R.D. (1987). Regulation of DNA synthesis in human fetal hepatocytes by placental lactogen, growth hormone, and insulin-like growth factor I/somatomedin-C. *J. Cell. Physiol.* *132*, 33–40.
- Stubert, J., Reister, F., Hartmann, S., and Janni, W. (2018). The Risks Associated With Obesity in Pregnancy. *Dtsch. Ärztebl. Int.* *115*, 276–283.
- Stulc, J. (1989). Extracellular transport pathways in the haemochorial placenta. *Placenta* *10*, 113–119.
- Stupin, J.H., and Arabin, B. (2014). Overweight and Obesity before, during and after Pregnancy. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* *74*, 639–645.
- Sturman, J.A. (1988). Taurine in development. *J. Nutr.* *118*, 1169–1176.
- Sugawara, T., Holt, J.A., Driscoll, D., Strauss, J.F., Lin, D., Miller, W.L., Patterson, D., Clancy, K.P., Hart, I.M., and Clark, B.J. (1995). Human steroidogenic acute regulatory protein: functional activity in COS-1 cells, tissue-specific expression, and mapping of the structural gene to 8p11.2 and a pseudogene to chromosome 13. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 4778–4782.
- Sun, X., Han, R., Wang, Z., and Chen, Y. (2006). Regulation of adiponectin receptors in hepatocytes by the peroxisome proliferator-activated receptor-γ agonist rosiglitazone. *Diabetologia* *49*, 1303–1310.
- Sun, X., He, J., Mao, C., Han, R., Wang, Z., Liu, Y., and Chen, Y. (2008). Negative regulation of adiponectin receptor 1 promoter by insulin via a repressive nuclear inhibitory protein element. *FEBS Lett.* *582*, 3401–3407.
- Sutcliffe, R.G., Kukulska-Langlands, B.M., Horne, C.H., Maclean, A.B., Jandial, V., Sutherland, H.W., Gibb, S., and Bowman, A.W. (1982). Studies on the concentration of pregnancy-associated plasma protein-A during normal and complicated pregnancy. *Placenta* *3*, 71–80.
- Szilágyi, A., Benz, R., and Rossmanith, W.G. (1993). Human chorionic gonadotropin secretion from the early human placenta: in vitro regulation by progesterone and its antagonist. *Gynecol. Endocrinol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Endocrinol.* *7*, 241–250.
- Takahashi, M., Arita, Y., Yamagata, K., Matsukawa, Y., Okutomi, K., Horie, M., Shimomura, I., Hotta, K., Kuriyama, H., Kihara, S., et al. (2000). Genomic structure and mutations in adipose-specific gene, adiponectin. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* *24*, 861–868.
- Takemura, Y., Osuga, Y., Harada, M., Hirata, T., Koga, K., Morimoto, C., Hirota, Y., Yoshino, O., Yano, T., and Taketani, Y. (2005). Serum adiponectin concentrations are decreased in women with endometriosis. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *20*, 3510–3513.
- Talukdar, S., Oh, D.Y., Bandyopadhyay, G., Li, D., Xu, J., McNelis, J., Lu, M., Li, P., Yan, Q., Zhu, Y., et al. (2012). Neutrophils mediate insulin resistance in high fat diet fed mice via secreted elastase. *Nat. Med.* *18*, 1407–1412.
- Tang, Z., Tadesse, S., Norwitz, E., Mor, G., Abrahams, V.M., and Guller, S. (2011). Isolation of Hofbauer cells from human term placentas with high yield and purity. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N* *1989* *66*, 336–348.

- Tarrade, A., Rousseau-Ralliard, D., Aubrière, M.-C., Peynot, N., Dahirel, M., Bertrand-Michel, J., Aguirre-Lavin, T., Morel, O., Beaujean, N., Duranthon, V., et al. (2013). Sexual Dimorphism of the Feto-Placental Phenotype in Response to a High Fat and Control Maternal Diets in a Rabbit Model. *PLoS ONE* 8.
- Tartaglia, L.A. (1997). The Leptin Receptor. *J. Biol. Chem.* 272, 6093–6096.
- Tartaglia, L.A., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Richards, G.J., Campfield, L.A., Clark, F.T., Deeds, J., et al. (1995). Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83, 1263–1271.
- Tatemoto, K., Hosoya, M., Habata, Y., Fujii, R., Kakegawa, T., Zou, M.X., Kawamata, Y., Fukusumi, S., Hinuma, S., Kitada, C., et al. (1998). Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251, 471–476.
- Taylor, S.S., Knighton, D.R., Zheng, J., Ten Eyck, L.F., and Sowadski, J.M. (1992). cAMP-dependent protein kinase and the protein kinase family. *Faraday Discuss.* 143–152.
- Tennekoon, K.H., Eswaramohan, T., and Karunanayake, E.H. (2007). Effect of leptin on prolactin and insulin-like growth factor-I secretion by cultured rat endometrial stromal cells. *Fertil. Steril.* 88, 193–199.
- Than, N.G., Pick, E., Bellyei, S., Szigeti, A., Burger, O., Berente, Z., Janaky, T., Boronkai, A., Kliman, H., Meiri, H., et al. (2004). Functional analyses of placental protein 13/galectin-13. *Eur. J. Biochem.* 271, 1065–1078.
- Tian, Z., Sun, R., Wei, H., and Gao, B. (2002). Impaired natural killer (NK) cell activity in leptin receptor deficient mice: leptin as a critical regulator in NK cell development and activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 298, 297–302.
- Tomas, E., Tsao, T.-S., Saha, A.K., Murrey, H.E., Zhang Cc, C. cheng, Itani, S.I., Lodish, H.F., and Ruderman, N.B. (2002). Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 16309–16313.
- Turner, H., Brüssow, K.-P., Alm, H., Ratky, J., Pöhland, R., Tuchscherer, A., and Kanitz, W. (2004). Mitochondrial aggregation patterns and activity in porcine oocytes and apoptosis in surrounding cumulus cells depends on the stage of pre-ovulatory maturation. *Theriogenology* 61, 1675–1689.
- Toro, A.R., Maymó, J.L., Ibarbalz, F.M., Pérez-Pérez, A., Maskin, B., Faletti, A.G., Sánchez-Margalet, V., and Varone, C.L. (2014). Leptin is an anti-apoptotic effector in placental cells involving p53 downregulation. *PLoS One* 9, e99187.
- Toth, P., Li, X., Rao, C.V., Lincoln, S.R., Sanfilippo, J.S., Spinnato, J.A., and Yussman, M.A. (1994). Expression of functional human chorionic gonadotropin/human luteinizing hormone receptor gene in human uterine arteries. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79, 307–315.
- Trayhurn, P., and Wood, I.S. (2004). Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br. J. Nutr.* 92, 347–355.
- Tsuchida, K., Nakatani, M., Hitachi, K., Uezumi, A., Sunada, Y., Ageta, H., and Inokuchi, K. (2009). Activin signaling as an emerging target for therapeutic interventions. *Cell Commun. Signal. CCS* 7, 15.
- Tu, H., Kastin, A.J., Hsueh, H., and Pan, W. (2008). Soluble receptor inhibits leptin transport. *J. Cell. Physiol.* 214, 301–305.
- Tuckey, R.C. (2005). Progesterone synthesis by the human placenta. *Placenta* 26, 273–281.
- Vandanmagsar, B., Youm, Y.-H., Ravussin, A., Galgani, J.E., Stadler, K., Mynatt, R.L., Ravussin, E., Stephens, J.M., and Dixit, V.D. (2011). The NALP3/NLRP3 Inflammasome Instigates Obesity-Induced Autoinflammation and Insulin Resistance. *Nat. Med.* 17, 179–188.
- Vardhana, P.A., and Illsley, N.P. (2002). Transepithelial glucose transport and metabolism in BeWo choriocarcinoma cells. *Placenta* 23, 653–660.
- Vaughan, O.R., Powell, T.L., and Jansson, T. (2019). Apelin is a novel regulator of human trophoblast amino acid transport. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.*
- Veenstra van Nieuwenhoven, A.L., Heineman, M.J., and Faas, M.M. (2003). The immunology of successful pregnancy. *Hum. Reprod. Update* 9, 347–357.
- Verrey, F. (2003). System L: heteromeric exchangers of large, neutral amino acids involved in directional transport. *Pflügers Arch.* 445, 529–533.
- von Versen-Höyneck, F., Rajakumar, A., Parrott, M.S., and Powers, R.W. (2009a). Leptin affects system A amino acid transport activity in the human placenta: evidence for STAT3 dependent mechanisms. *Placenta* 30, 361–367.

- von Versen-Höyneck, F., Rajakumar, A., Parrott, M.S., and Powers, R.W. (2009b). Leptin Affects System A Amino Acid Transport Activity in the Human Placenta: Evidence for STAT3 Dependent Mechanisms. *Placenta* 30, 361–367.
- Vidal, H., Auboeuf, D., De Vos, P., Staels, B., Riou, J.P., Auwerx, J., and Laville, M. (1996). The expression of ob gene is not acutely regulated by insulin and fasting in human abdominal subcutaneous adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 98, 251–255.
- Wada, N., Hirako, S., Takenoya, F., Kageyama, H., Okabe, M., and Shioda, S. (2014). Leptin and its receptors. *J. Chem. Neuroanat.* 61–62, 191–199.
- Waki, H., Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Uchida, S., Kita, S., Hara, K., Hada, Y., Vasseur, F., Froguel, P., et al. (2003). Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J. Biol. Chem.* 278, 40352–40363.
- Waki, H., Yamauchi, T., Kamon, J., Kita, S., Ito, Y., Hada, Y., Uchida, S., Tsuchida, A., Takekawa, S., and Kadowaki, T. (2005). Generation of globular fragment of adiponectin by leukocyte elastase secreted by monocytic cell line THP-1. *Endocrinology* 146, 790–796.
- Wallace, A.E., Fraser, R., and Cartwright, J.E. (2012). Extravillous trophoblast and decidual natural killer cells: a remodelling partnership. *Hum. Reprod. Update* 18, 458–471.
- Walton, K.L., Mankanji, Y., and Harrison, C.A. (2012). New insights into the mechanisms of activin action and inhibition. *Mol. Cell. Endocrinol.* 359, 2–12.
- Wang, C., Mao, X., Wang, L., Liu, M., Wetzel, M.D., Guan, K.-L., Dong, L.Q., and Liu, F. (2007). Adiponectin Sensitizes Insulin Signaling by Reducing p70 S6 Kinase-mediated Serine Phosphorylation of IRS-1. *J. Biol. Chem.* 282, 7991–7996.
- Wang, C., Xin, X., Xiang, R., Ramos, F.J., Liu, M., Lee, H.J., Chen, H., Mao, X., Kikani, C.K., Liu, F., et al. (2009). Yin-Yang regulation of adiponectin signaling by APPL isoforms in muscle cells. *J. Biol. Chem.* 284, 31608–31615.
- Wang, J., Liu, S., Qin, H.-M., Zhao, Y., Wang, X.-Q., and Yan, Q. (2014). Pregnancy-associated plasma protein A up-regulated by progesterone promotes adhesion and proliferation of trophoblastic cells. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 7, 1427–1437.
- Wang, M.-Y., Yan, T.Z., Newgard, C.B., and Unger, R.H. (1996). A novel leptin receptor isoform in rat. *FEBS Lett.* 392, 87–90.
- Wang, Y., Lam, K.S.L., Chan, L., Chan, K.W., Lam, J.B.B., Lam, M.C., Hoo, R.C.L., Mak, W.W.N., Cooper, G.J.S., and Xu, A. (2006). 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. *J. Biol. Chem.* 281, 16391–16400.
- Wang, Y., Lam, K.S.L., Yau, M., and Xu, A. (2008). Post-translational modifications of adiponectin: mechanisms and functional implications. *Biochem. J.* 409, 623–633.
- Warskulat, U., Heller-Stilb, B., Oermann, E., Zilles, K., Haas, H., Lang, F., and Häussinger, D. (2007). Phenotype of the taurine transporter knockout mouse. *Methods Enzymol.* 428, 439–458.
- Watari, H., Arakane, F., Moog-Lutz, C., Kallen, C.B., Tomasetto, C., Gerton, G.L., Rio, M.C., Baker, M.E., and Strauss, J.F. (1997). MLN64 contains a domain with homology to the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) that stimulates steroidogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 8462–8467.
- Wedellova, Z., Kovacova, Z., Tencerova, M., Vedral, T., Rossmeislova, L., Siklova-Vitkova, M., Stich, V., and Polak, J. (2013). The Impact of Full-Length, Trimeric and Globular Adiponectin on Lipolysis in Subcutaneous and Visceral Adipocytes of Obese and Non-Obese Women. *PLoS One* 8, e66783.
- Wei, S., Schmidt, M.D., Dwyer, T., Norman, R.J., and Venn, A.J. (2009). Obesity and menstrual irregularity: associations with SHBG, testosterone, and insulin. *Obes. Silver Spring Md* 17, 1070–1076.
- Weigert, J., Neumeier, M., Wanninger, J., Filarsky, M., Bauer, S., Wiest, R., Farkas, S., Scherer, M.N., Schäffler, A., Aslanidis, C., et al. (2010). Systemic chemerin is related to inflammation rather than obesity in type 2 diabetes. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 72, 342–348.
- Weiss, J.L., Malone, F.D., Emig, D., Ball, R.H., Nyberg, D.A., Comstock, C.H., Saade, G., Eddleman, K., Carter, S.M., Craigo, S.D., et al. (2004). Obesity, obstetric complications and cesarean delivery rate—a population-based screening study. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 190, 1091–1097.
- Wen, J.-P., Liu, C., Bi, W.-K., Hu, Y.-T., Chen, Q., Huang, H., Liang, J.-X., Li, L.-T., Lin, L.-X., and Chen, G. (2012). Adiponectin inhibits KISS1 gene transcription through AMPK and specificity protein-1 in the hypothalamic GT1-7 neurons. *J. Endocrinol.* 214, 177–189.
- Williams, L.B., Fawcett, R.L., Waechter, A.S., Zhang, P., Kogon, B.E., Jones, R., Inman, M., Huse, J., and Considine, R.V. (2000). Leptin production in adipocytes from morbidly obese subjects: stimulation by dexamethasone, inhibition with troglitazone, and influence of gender. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 2678–2684.

- Williamson, D.F., Madans, J., Anda, R.F., Kleinman, J.C., Kahn, H.S., and Byers, T. (1993). Recreational physical activity and ten-year weight change in a US national cohort. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* *17*, 279–286.
- Winer, D.A., Winer, S., Shen, L., Wadia, P.P., Yantha, J., Paltser, G., Tsui, H., Wu, P., Davidson, M.G., Alonso, M.N., et al. (2011). B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies. *Nat. Med.* *17*, 610–617.
- Winer, S., Chan, Y., Paltser, G., Truong, D., Tsui, H., Bahrami, J., Dorfman, R., Wang, Y., Zielenski, J., Mastronardi, F., et al. (2009). Normalization of Obesity-Associated Insulin Resistance through Immunotherapy: CD4+ T Cells Control Glucose Homeostasis. *Nat. Med.* *15*, 921–929.
- Winfield, J., Esbitt, A., Seutter, S.F., Desai, B., Abdo, M., Vasconez, M., Laidlaw, W., Green, K., Shamseddin, S.M., and Borghaei, R.C. (2016). Effect of Inflammatory Cytokines on DNA Methylation and Demethylation. *FASEB J.* *30*, 1053.3-1053.3.
- Wolf, A.M., Wolf, D., Rumpold, H., Enrich, B., and Tilg, H. (2004). Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *323*, 630–635.
- Wu, Q., and Ni, X. (2015). ROS-mediated DNA methylation pattern alterations in carcinogenesis. *Curr. Drug Targets* *16*, 13–19.
- Wu, D., Molofsky, A.B., Liang, H.-E., Ricardo-Gonzalez, R.R., Jouihan, H.A., Bando, J.K., Chawla, A., and Locksley, R.M. (2011). Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science* *332*, 243–247.
- Wu, Y.-H., Lo, H.-F., Chen, S.-H., and Chen, H. (2013). Caspase-14 suppresses GCM1 acetylation and inhibits placental cell differentiation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *27*, 2818–2828.
- Wu, Z., Bidlingmaier, M., Liu, C., De Souza, E.B., Tschöp, M., Morrison, K.M., and Strasburger, C.J. (2002). Quantification of the soluble leptin receptor in human blood by ligand-mediated immunofunctional assay. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *87*, 2931–2939.
- Wulster-Radcliffe, M.C., Ajuwon, K.M., Wang, J., Christian, J.A., and Spurlock, M.E. (2004). Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *316*, 924–929.
- Xiao, B., Sanders, M.J., Underwood, E., Heath, R., Mayer, F.V., Carmena, D., Jing, C., Walker, P.A., Eccleston, J.F., Haire, L.F., et al. (2011). Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature* *472*, 230–233.
- Xie, L., Fu, Q., Ortega, T.M., Zhou, L., Rasmussen, D., O’Keefe, J., Zhang, K.K., and Chapes, S.K. (2014). Overexpression of IL-10 in C2D macrophages promotes a macrophage phenotypic switch in adipose tissue environments. *PLoS One* *9*, e86541.
- Xin, X., Zhou, L., Reyes, C.M., Liu, F., and Dong, L.Q. (2011). APPL1 mediates adiponectin-stimulated p38 MAPK activation by scaffolding the TAK1-MKK3-p38 MAPK pathway. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *300*, E103-110.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Terauchi, Y., Kubota, N., Hara, K., Mori, Y., Ide, T., Murakami, K., Tsuboyama-Kasaoka, N., et al. (2001). The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat. Med.* *7*, 941–946.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kita, S., Sugiyama, T., Miyagishi, M., Hara, K., Tsunoda, M., et al. (2003). Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* *423*, 762–769.
- Yamauchi, T., Iwabu, M., Okada-Iwabu, M., and Kadowaki, T. (2014). Adiponectin receptors: A review of their structure, function and how they work. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* *28*, 15–23.
- Yu, W.H., Kimura, M., Walczewska, A., Karanth, S., and McCann, S.M. (1997). Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 1023–1028.
- Yuan, G., Chen, X., Ma, Q., Qiao, J., Li, R., Li, X., Li, S., Tang, J., Zhou, L., Song, H., et al. (2007). C-reactive protein inhibits adiponectin gene expression and secretion in 3T3-L1 adipocytes. *J. Endocrinol.* *194*, 275–281.
- Yue, P., Jin, H., Aillaud, M., Deng, A.C., Azuma, J., Asagami, T., Kundu, R.K., Reaven, G.M., Quertermous, T., and Tsao, P.S. (2010). Apelin is necessary for the maintenance of insulin sensitivity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *298*, E59-67.
- Yura, S., Sagawa, N., Itoh, H., Kakui, K., Nuamah, M.A., Korita, D., Takemura, M., and Fujii, S. (2003). Resistin is expressed in the human placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *88*, 1394–1397.
- Zabel, B.A., Nakae, S., Zúñiga, L., Kim, J.-Y., Ohyama, T., Alt, C., Pan, J., Suto, H., Soler, D., Allen, S.J., et al. (2008). Mast cell-expressed orphan receptor CCRL2 binds chemerin and is required for optimal induction of IgE-mediated passive cutaneous anaphylaxis. *J. Exp. Med.* *205*, 2207–2220.

- Zabel, B.A., Kwitniewski, M., Banas, M., Zabieglo, K., Murzyn, K., and Cichy, J. (2014). Chemerin regulation and role in host defense. *Am. J. Clin. Exp. Immunol.* 3, 1–19.
- Zarkesh-Esfahani, H., Pockley, G., Metcalfe, R.A., Bidlingmaier, M., Wu, Z., Ajami, A., Weetman, A.P., Strasburger, C.J., and Ross, R.J. (2001). High-dose leptin activates human leukocytes via receptor expression on monocytes. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 167, 4593–4599.
- Zarkesh-Esfahani, H., Pockley, A.G., Wu, Z., Hellewell, P.G., Weetman, A.P., and Ross, R.J.M. (2004). Leptin Indirectly Activates Human Neutrophils via Induction of TNF- α . *J. Immunol.* 172, 1809–1814.
- Zhang, F., Basinski, M.B., Beals, J.M., Briggs, S.L., Churgay, L.M., Clawson, D.K., DiMarchi, R.D., Furman, T.C., Hale, J.E., Hsiung, H.M., et al. (1997). Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature* 387, 206–209.
- Zhang, J., Hampton, A.L., Nie, G., and Salamonsen, L.A. (2000). Progesterone inhibits activation of latent matrix metalloproteinase (MMP)-2 by membrane-type 1 MMP: enzymes coordinately expressed in human endometrium. *Biol. Reprod.* 62, 85–94.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425–432.
- Zhu, M.J., Du, M., Nijland, M.J., Nathanielsz, P.W., Hess, B.W., Moss, G.E., and Ford, S.P. (2009). Down-regulation of growth signaling pathways linked to a reduced cotyledonary vascularity in placentomes of over-nourished, obese pregnant ewes. *Placenta* 30, 405–410.
- Zygmunt, M., Herr, F., Keller-Schoenwetter, S., Kunzi-Rapp, K., Münstedt, K., Rao, C.V., Lang, U., and Preissner, K.T. (2002). Characterization of Human Chorionic Gonadotropin as a Novel Angiogenic Factor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 5290–5296.

COMMUNICATIONS

Communications orales

Avril 2019 : 3^e journées Reprosiences 2019 – GDR Repro – Toulouse

Impact de l'obésité maternelle sur le transport des nutriments et le statut inflammatoire dans le placenta humain de 3^e trimestre

Mars 2019 : Journée thésards - INRA de Jouy-en-Josas

Impact de l'obésité maternelle sur les fonctions placentaires : rôles de la leptine et de l'adiponectine

Mars 2019 : 7^e colloque international du groupe de la francophonie placentaire – Paris

Impact de l'obésité maternelle sur le transport des nutriments et le statut inflammatoire dans le placenta humain de 3^e trimestre

Mai 2018 : Journée thésards - INRA de Jouy-en-Josas

Impact de l'obésité maternelle sur les fonctions placentaires : rôles de la leptine et de l'adiponectine

Septembre 2017 : 6^e colloque international du groupe de la francophonie placentaire – Grenoble

Impact de l'obésité maternelle sur l'expression des systèmes leptine et adiponectine dans le placenta humain de 3^e trimestre

Juin 2017 : Journée thésards - INRA de Jouy-en-Josas

Impact de l'obésité maternelle sur les fonctions placentaires : rôles de la leptine et de l'adiponectine

Posters

Avril 2019 : 3^e journées Reprosiences 2019 – GDR Repro – Toulouse

Impact de l'obésité maternelle sur le transport des nutriments et le statut inflammatoire dans le placenta humain de 3^e trimestre

Mars 2018 : Journée de l'ED SDSV – Paris-Saclay

Impact of maternal obesity on leptin and adiponectin systems in human third trimester placenta

Impact de l'obésité maternelle sur les fonctions placentaire : rôles de la leptine et de l'adiponectine

Mots clés : fonctions placentaires, leptine, adiponectine, programmation foetale

L'obésité se définit par une accumulation excessive de masse grasse et une inflammation systémique chronique. Elle se mesure par un indice de masse corporelle supérieur à 30 kg/m². L'obésité maternelle est associée à de nombreux troubles de la santé et en particulier à un risque accru de développer des pathologies de la grossesse (pré éclampsie, diabète gestationnel). D'autre part, l'obésité maternelle impacte la descendance avec une augmentation des risques d'apparition de maladies métaboliques à l'âge adulte.

Le placenta est un organe présent à l'interface entre la mère et le fœtus. Il assure des fonctions endocrines, d'échanges et de protection immunitaire.

La leptine et l'adiponectine sont des adipokines majoritairement produites par le tissu adipeux. La leptine joue un rôle satiétogène et l'adiponectine exerce des effets insulino-sensibilisateurs. Elles sont donc impliquées dans l'homéostasie énergétique.

Le placenta exprime la leptine et les récepteurs spécifiques de ces deux hormones. Il est bien établi que la leptine et l'adiponectine participent au contrôle des fonctions placentaires.

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'impact de l'obésité maternelle (sans diabète gestationnel) sur les principales fonctions du placenta humain.

Dans une première partie, nous avons montré que l'obésité maternelle entraîne i) une diminution de l'expression des transporteurs de nutriments, ii) une diminution du nombre de cellules immunitaires, iii) une altération des capillaires fœtaux et iv) une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires et de l'hormone chorionique gonadotrope (hCG) dans le placenta à terme.

Dans une deuxième partie, nous avons montré que l'obésité maternelle altère l'expression des systèmes leptine et adiponectine (ligand et récepteurs) dans le placenta humain. En effet, l'obésité maternelle conduit à une diminution de l'expression des récepteurs des deux hormones et à une modification de la méthylation des régions promotrices des gènes codant pour les deux adipokines et leurs récepteurs.

L'ensemble de ces résultats montre que l'obésité maternelle altère les fonctions endocrines, d'échanges et immunitaires du placenta. Cet organe transitoire semble s'adapter à un environnement maternel délétère.

Impact of maternal obesity on placental functions : roles of leptin and adiponectin

Key words : placental functions, leptin, adiponectin, fetal programming

Obesity is defined as an excessive accumulation of fat mass and chronic low grade inflammation. Obesity is indicated by a body mass index higher than 30 m²/kg. Maternal obesity is associated with health disorders and creates a higher risk for the development of pregnancy complications (pre-eclampsia and gestational diabetes). In addition to obesity having an impact on a pregnant woman, the fetus is also at risk of developing metabolic disorders in adulthood.

The placenta is the organ present at the interface between the mother and the fetus. The placenta's role is to ensure endocrine functions, exchange functions, and immune protection.

Leptin and adiponectin are mostly produced by the adipose tissue. Leptin is a key player in satiety, whereas adiponectin displays an insulin-sensitizing effect. Therefore, both are involved in the energy homeostasis and both are well-established as being involved in the control of placental functions.

In this research, we investigated the impact of maternal obesity (without gestational diabetes) on the major functions of the human placenta.

In a first part, we have shown that maternal obesity leads to i) a lower expression of nutrient transporters, ii) a lower count of immune cells, iii) an alteration of fetal capillaries, and iv) a decrease in the production of pro-inflammatory cytokines and gonadotropic chorionic hormone (hCG) in term placenta.

Also covered in this research is that maternal obesity impairs the leptin and adiponectin systems (ligand and receptors) in the human placenta. Our results indicate maternal obesity is associated with a lower expression of the two adipokines receptors; as well as to a modification in the DNA methylation of promoter regions of the genes' coding for the two hormones and their receptors.

The conclusion of the research reveals how maternal obesity affects the endocrine, exchange, and immune functions of the placenta and how this transient organ seems to adapt itself to a harmful maternal environment.