HAL
open science

Rôle de la protéine NLRP7 dans la placentation normale et tumorale : cas du choriocarcinome

Déborah Reynaud

To cite this version:

Déborah Reynaud. Rôle de la protéine NLRP7 dans la placentation normale et tumorale : cas du choriocarcinome. Biologie du développement. Université Grenoble Alpes, 2018. Français. NNT : 2018GREAV073 . tel-02909698

HAL Id: tel-02909698

https://theses.hal.science/tel-02909698

Submitted on 31 Jul 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.

Communauté UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biologie du développement Oncogenèse**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Déborah Reynaud

Thèse dirigée par le **Dr. Nadia Alfaidy,**
Directeur de recherche INSERM, Institut de Biosciences et Biotechnologies de Grenoble

Préparée au sein du **Laboratoire de Biologie du Cancer et de l'Infection** et de **l'École Doctorale Chimie Sciences du Vivant**

Rôle de la protéine NLRP7 dans la placentation normale et tumorale : Cas du choriocarcinome

Thèse soutenue publiquement le **21 décembre 2018**,
devant le jury composé de :

Mr Jean-Jacques FEIGE
Directeur de recherche INSERM et Directeur du Laboratoire de Biologie du Cancer et de l'Infection, Président
Mme, Marie-Benoite COHEN
Professeur, Université de Genève, Rapporteur
Mr Daniel VAIMAN
Directeur de recherche INSERM, Institut Cochin, Rapporteur
Mme Marie-Noëlle DIEUDONNÉ
Professeur, Université Versailles - Saint Quentin, Examinateur
Mr François GOLFIER
Professeur, Université Claude Bernard – Lyon 1, Examinateur

à mes parents ;

à mes grands-parents ;

à Pierre et Ruben, et plus si affinités…

« Il faut toujours viser la lune,
car même en cas d'échec on atterrit dans les étoiles. »
Oscar Wilde

Remerciements

Je tiens tout d'abord à présenter mes sincères remerciements à tous les membres de mon jury de thèse pour avoir accepté de le composer. Merci au **Pr Marie Cohen** et au **Dr Daniel Vaiman** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Merci au **Pr Marie-Noëlle Dieudonné** et au **Pr François Golfier** d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Merci au **Dr Jean-Jacques Feige** d'avoir accepté d'être Président de ce jury mais pas seulement. Merci à toi d'avoir toujours été bienveillant au cours de ces quatre années. Merci d'avoir été un des acteurs principaux de ma formation scientifique {*et aussi œnologique et sportive, grâce à toi j'ai découvert le tir à l'arc et le biathlon, top !*}. Ça a été un plaisir de faire partie de ce laboratoire où tu sais préserver une ambiance agréable.

Merci au **Dr Pierre-Adrien Bolze**, au **Dr Serge Candeias** et au **Pr Pierre Ray** d'avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse et de nous avoir guidé au mieux dans ce projet.

Merci à l'ensemble des collaborateurs, et plus particulièrement les **Dr Padma Murthi**, **Rima Slim** et **Vincent Sapin** d'avoir toujours un peu plus enrichi ce projet tant sur le fond que sur la forme.

Nadia : je te dois tant de Mercis. Merci de m'avoir permis d'atteindre mon ultime objectif, merci de m'avoir fait confiance. Merci d'avoir partagé ton expérience et tes connaissances et de m'avoir guidée tout au long de ces années. Merci de m'avoir laissée m'investir dans tous nos projets ainsi que dans mon choix de faire de l'enseignement ; nous avons essuyé quelques critiques mais j'ai tant appris grâce à toi. Tu m'as permis de m'épanouir pleinement professionnellement. Je suis consciente que, à cause des difficultés, cette chance n'est pas donnée à tous les étudiants et que je te dois beaucoup. Enfin car celui-ci me tient à cœur {*il y en a encore beaucoup d'autres mais ce serait trop long d'en faire une liste exhaustive !!!*}, merci de ta réaction positive et bienveillante lorsque je t'ai annoncé ma grossesse et de n'avoir eu pour seul *a priori* que : « la maternité ferait de moi une étudiante plus responsable et organisée ». Je ne suis pas certaine que ces deux adjectifs soient ceux qui m'aient le mieux défini mais je sais que ton absence de jugement et ta positivité face à cette situation m'ont donné le courage de croire en mes rêves malgré tout. Si j'ai pu aussi démontrer grâce à ce travail de thèse que la maternité n'est pas un obstacle et que seuls la motivation et le courage comptent alors ce serait une double fierté.

Je dois également quelques mercis à **Mohamed** : tu as toujours été à nos côtés dans les projets. Merci d'avoir partagé ton expérience avec moi, d'avoir toujours un mot d'encouragement et d'être présent à chaque fois que j'ai besoin. Quand j'ai expliqué à Ruben qu'il fallait encore écrire les remerciements du « gros livre », sa réaction a été que je ne devais surtout pas oublier « le chef ». J'ai pris cette remarque comme un juste retour de l'affection que tu lui portes. Promis, je vais prendre bien soin de lui et je vous enverrais de nos nouvelles.

Merci également aux **membres de l'institut BIG** qui ont accepté de partager avec moi leurs connaissances, le **Dr Emmanuelle Soleilhac** qui m'a formée à l'utilisation de l'Incucyte, le **Dr Gilles Courtois** qui a partagé des informations précieuses sur le fonctionnement de la voie NF-κB et le **Dr Véronique Collin-Faure** qui m'a initiée aux joies du tri par FACS.

Je tiens maintenant à remercier **l'ensemble des membres du laboratoire BCI**, présent et passé. Vous avez tous, de près ou de loin, sur les plans scientifique et/ou personnel, permis de faire de ces quatre ans à vos côtés un plaisir de chaque jour. Merci à tous pour votre soutien, votre écoute et vos conseils.

Ah, les **Cochet's**, une mine de trésors (matériels et immatériels). Toujours gentils, de grands sourires même quand je viens encore poser une question, demander un conseil ou de l'aide. Vous êtes inspirants, un vrai plaisir à côtoyer au quotidien. Merci **Odile** d'avoir toujours répondu présente quand j'en avais besoin et même quand j'ai pu être maladroite {*j'ai une tendance naturelle à mettre les pieds dans le plat !* ☺}. **Claude**, un puit {*sans fond*} de science ! J'aimerais être au moins à moitié aussi passionnée que toi par notre métier. Je repars pleine d'admiration et de bons souvenirs. Merci à vous deux d'avoir aussi partagé vos plaisirs extraprofessionnels notamment en conseils voyages. Les plages de l' « isola Maddalena », même sans vélo, nous ont laissé un souvenir impérissable… et je me sens presque prête pour le trek du Machu Picchu {*ahah, dans mes rêves !!!*}.

Nadia C. : je te dois peut-être aussi quelques excuses. C'est le jeu des bureaux communs mais j'espère ne pas t'avoir trop dérangée en venant partager mes découvertes et déceptions expérimentales avec Nadia. Je ne te souhaite que le meilleur pour la suite.

Je remercie également nos nouveaux venus, experts en bio-informatique, **Laurent**, **Rémi**, **Christophe et Bruno**. Je ne vous ai pas toujours compris mais merci de m'avoir enrichie de quelques-unes de vos connaissances en stats, analyses Bio-info et de vos conseils manip et résultats de RNA-Seq. {*Bon aussi montagne et éducation de jeunes enfants* ☺}

Emma : je tiens à te dire un merci tout particulier pour m'avoir initiée à la dure tâche qu'est l'enseignement. Tu m'as fait confiance et je t'en remercie. Grâce à toi, j'ai eu la chance d'être intégrée dans deux super équipes pédagogiques et j'ai pu expérimenter toutes les formes d'enseignement, MERCI. Merci aussi à **Agnès** : en arrivant je n'avais jamais touché une pipette et, grâce à toi, j'ai fini mon M2 avec analyse différentielle du nombre de copies pour 16 gènes en qPCR. Tu étais la seule à pouvoir faire une chose pareille ! Je n'oublierai jamais le temps et la patience que tu m'as accordés. Merci à vous deux pour votre bonne humeur {*bon quand Emma ne corrige pas les copies des L1 ou que le papier est « not yet rejected » !* ☺}, vos encouragements et pour tous les bons moments passés ensemble autour d'un verre de vin ou de saké…

Fred, l'ours, à toi aussi je te dois beaucoup… Je n'étais qu'une étudiante de plus à former mais j'ai pris beaucoup de plaisir à apprendre à tes côtés {*Arf,* ***Caro****, effacez moi ce sourire tous les deux. Je n'ai pas l'esprit mal tordu, Moi !* ***Marie*** *je sais que toi tu n'y avais même pas pensé…*} Merci de ton aide au cours de ces quatre ans, et plus particulièrement ces derniers mois où j'ai été gourmande de ton temps. En tout cas, je n'oublierais jamais l'heure pour les relevés de plug et les détails des pratiques sexuelles des souris. Merci de m'avoir accordé quelques moments de bonne humeur ; nos rigolades me manqueront et même si on en a parfois rigolé, je connais ta valeur.

Wael : merci de nous avoir donné tous tes « petits trucs » pour que l'on commence bien ce projet. J'ai gardé les protocoles sur les feuilles de papier absorbant comme des trésors… Merci d'être resté disponible pour chacune de mes interrogations même après ton départ. Je te souhaite une vie épanouissante, riche de découvertes et des projets scientifiques et personnels tout aussi passionnants.

Ro, **MON Ro** ! Tu m'as tellement manqué cette année. Notre binôme avait tout d'une vraie relation de couple {*on en a fait rigoler plus d'un ! et douter certains…*}. Soudés, notre amitié en ressort grandie et nos désaccords nous ont permis de donner le meilleur de nous-mêmes pour résoudre les problèmes. Sans toi, rien de tout cela n'aurait été pareil et je n'aurais pas tant appris. Merci pour ton soutien quotidien, merci de m'avoir redonné confiance à chaque fois que je doutais. Je te souhaite de réaliser tes rêves, « un jour, tu seras chercheur ». N'hésites pas, je serais toujours disponible pour les conseils d'orientation et autres traductions douteuses des manuels de Français Libanais… Je serais heureuse de toute nouvelle collaboration et n'oublies pas que je suis déterminée à ce que tu m'apprennes à faire les FIV… ☺ ☺ ☺

Merci aussi à tous les **étudiants** rencontrés au cours de ces quatre ans. Vous avez tous participé au plaisir de venir travailler et certains à l'amélioration de mes capacités pédagogiques ou organisationnelles {*J'ai aimé être un lutin du père noël !!!*}. Plus particulièrement, merci à **Vi** et **Dung** vous avez payé les pots cassés de mon anglais niveau débutant mais vous m'avez permis de progresser à une vitesse impressionnante {*Je n'ai presque plus honte de parler Anglais…*} Mention spéciale à **Quentin** : tu n'es certes pas vétérinaire mais pourtant la pédiatre à confirmer chacun de tes diagnostics à distance... On a bien ri, tu as cette capacité à donner le sourire les mauvais jours ; ça a été un vrai plaisir de te côtoyer. Je vous souhaite à tous bonne réussite pour la suite.

Daniel et **Mariela** : merci à vous deux pour tous les bons moments passés en salle de culture, pour nos rigolades « Curling » {*Ah Daniel, avec le temps il faudra penser à prendre l'étuve du haut… !* ☺} mais aussi et surtout pour tous vos conseils Contamination/Décontamination, conservation des cellules… J'ai beaucoup appris.

J'en profite aussi pour remercier **Josiane** : tu as été une des rares à me tenir compagnie en bas jusqu'à point d'heure… Merci de veiller à notre sécurité et d'avoir toujours fait attention de me signifier lorsque j'étais la dernière ou que j'avais oublié de remettre mes chaussures. Promis, dans mon prochain labo, je m'équiperai de chaussettes de sécurité… ☺

Merci à **Sylvie, Philipe, Eric** et **Mylène** qui, malgré le champ {*obscur pour moi*} de la biologie qui les passionne, n'ont jamais hésité à m'aider et me conseiller dans les manips, les protocoles, le choix des kits…

Claire, nous n'avons pas eu l'occasion de beaucoup nous côtoyer mais je voulais te dire merci d'avoir partagé ton expérience et ton parcours avec moi. Merci de m'avoir montré qu'il est encore possible de faire une carrière dans la recherche aujourd'hui sans oublier qui on est et sans avoir à se justifier des choix personnels que l'on fait. Je suis admirative de ton parcours, j'espère faire aussi bien… Bonne continuation.

Un grand merci aussi à **tous les membres non scientifiques du labo**, vous faites toujours de votre mieux pour nous aider au quotidien. Mention spéciale à **M-P** : tu as fait aussi beaucoup plus… Je garderais toujours en mémoire cette photo avec Pierrot tout en haut de l'arbre. Même dans nos délires accrobranche tu étais là. Que de bons moments passés ensemble. **Christine** : ravie d'avoir monté notre petite équipe « repas du midi » à tes côtés. Je m'en vais contente de savoir que tu ne mangeras plus toute seule… Et un immense merci d'avoir toujours relevé mes défis couture. Il y aura toujours un peu de toi chez nous, Krockmou nous suivra jusqu'au bout monde.

Merci aussi à **Nico, Isa, Irène** et **Hervé**, notre super équipe de l'animalerie qui a toujours répondu présente lorsque j'avais besoin d'aide et de conseil avec les animaux. J'ai essayé de me faire discrète mais j'avoue avoir encore besoin d'entrainement… Vous avez tous été au top, **Nico** portes toi bien et fais attention la découverte du monde du labo et des manips rend accro ! **Isa**, plein de bonheur dans cette nouvelle aventure. Tu verras être parent est le plus difficile boulot au monde mais sans aucun doute le plus merveilleux… **Irène**, je te souhaite une bonne retraite, profites bien de ta nouvelle vie !

Bon **les filles**, il aura fallu plus trois pages pour que ce soit votre tour… En même temps, vous êtes maintenant à la frontière entre le Pro et le Perso, entre collègues et famille. Bien sûr, parfois, nous papotions science mais nous faisions surtout office de pilier les unes pour les autres ! Alors merci car vous êtes entrée dans ma vie à une période où plus grand chose ne pouvait aller plus mal et j'ai remonté la pente bien plus vite à vos côtés. J'espère avoir su vous rendre au moins un peu de ce que vous m'avez apporté. Bon, sur un plan moins mélodramatique parce que je ne suis pas très douée pour ça ; **Marie**, grâce à toi j'ai appris à modeler des souriceaux P1 en pâte Fimo. Alors d'accord, j'ai aussi appris à gonfler des poumons de PFA mais ce n'est pas à cette occasion que j'ai pu dire « Tata, je mets les bébés au four ? » ☺ la crise de rire, je te jure, tu as raté ! **Caro**, grâce à toi, j'ai appris que j'étais capable de marcher 2 km de pente à 50% mais je t'en prie, la prochaine on ne dépasse plus 2800 m parce que sinon je serais capable de cracher mes poumons à 1600 juste pour me sentir mieux… J'ai aussi appris que mes hommes n'étaient pas fous de se baigner dans une eau à 15°C, juste Normand ! Je n'ose pas imaginer la façon dont on devra s'y prendre à l'avenir pour organiser nos soirées. {*Aller, avec des agendas sur 12 mois, on trouvera peut-être un weekend !!!* ☺} De toute façon, on n'a pas le choix : les stats Cadillac vs Madiran ne sont toujours pas significatives… Encore merci les filles pour cette belle amitié, ça n'a pas de prix !!!

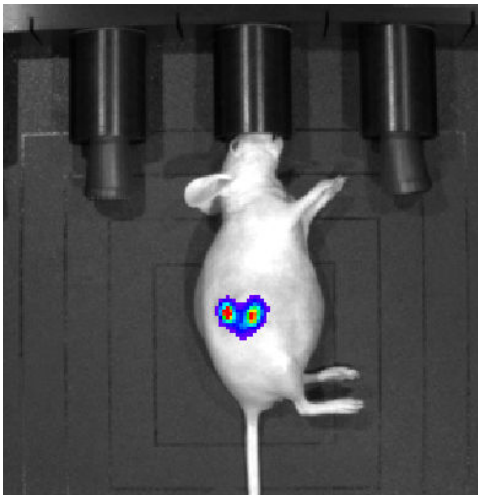
Je tiens à remercier aussi **mes grands-parents** : vous n'avez jamais rien compris à ce que je faisais mais vos yeux débordants de fierté sont ma plus belle récompense. **Mima**, tu ne m'as jamais lâchée et si je sais lire aujourd'hui, une chose est sure, ce n'est pas grâce à l'école ! {*Maman, désolée, le participe passé c'est toujours un peu bancal, tu aurais peut-être dû laisser faire mima*…} Et **pipa**, tu sais, je continue de penser qu'il n'y a pas de sot métier et je m'éclate toujours autant sur les marchés. Alors quelque part **Tonton** a raison, je peux faire toutes les études du monde, j'y retournerais toujours !!!

D'ailleurs, je leur dois un merci à eux aussi. **Tata et Tonton** : vous avez été mes meilleurs professeurs dans plein de domaines. Les notions de plaisir à travailler, de courage et de communication, c'est en grande partie à vous que je les dois. Merci de m'avoir considérée comme votre fille chaque été ! {*Ceci dit peut-être qu'à partir de cinq on est plus à deux ou trois près…* ☺}

Un immense merci maintenant à **mes parents** : ceux sans qui rien de ce que j'ai aujourd'hui ne serait réel. Si on se retourne sur les 11 années qui viennent de s'écouler, j'ai beaucoup travaillé, c'est vrai, mais votre amour et votre soutien inconditionnels sont les constantes qui ont rendu tout cela possible. Je mesure ma chance. J'ai fait des choix qui n'auraient pas été les vôtres et malgré tout, vous avez fait tout ce qui était en votre pouvoir pour faire de mon rêve, ma vie. Et si vous aviez juste été des parents formidables, je serais déjà la plus chanceuse mais en plus vous êtes des taxis {*Maman, tu peux venir me chercher au CEA ? on vient juste de terminer la manip et j'ai raté le dernier bus*…}, des intendants {*Tiens va dans le frigo, j'ai cuisiné pour la semaine ! Et donnes-moi ton linge que je m'en occupe*}, des bricoleurs {*Papa, tu nous apprends à poser du carrelage* ?}, des nounous {*Papa, tu peux aller chercher le petit à l'école et Maman, tu nous le gardes ce soir ? Nous sommes invités chez des copains ! }*, des grands-parents *{Non ! Toi tu rentres à la maison et moi je reste chez papi et mamie…}* FORMIDABLES… Maman, tu sais à la fin du collège quand les profs voulaient m'envoyer en BEP parce que j'étais trop nulle et que je perdrais mon temps à aller au lycée, tu m'as dit « tu feras ce que tu veux dans la vie mais d'abord tu fais des études ! »… Je peux m'arrêter maintenant ? Tu sais y'en plus d'autres des diplômes après, c'est le max là… ☺ Merci à vous deux d'avoir toujours été là pour moi et pour nous.

Mes amours c'est votre tour : rien n'a jamais été facile mais on l'a fait… **Pierre**, on peut nous aussi nous retourner sur les 11 dernières années et merci à toi d'être encore là ! Je me demande quand même encore si tu n'es pas un peu maso d'avoir subi tout ça alors que les études « ça sert à rien !!! ». Merci de continuer d'écrire notre livre malgré les ratures et les pages arrachées. **Ruben** et toi m'avez été indispensables au cours de ces quatre années. Grâce à vous deux je voyais qu'il n'y a pas que le travail dans la vie, j'aurais pu m'y perdre ! J'espère que, dans chacune de nos futures aventures, nous arriverons à trouver notre déséquilibre parfait. {*Je vous aime*}.

Ma dernière pensée va à **mes petites copines**, merci les filles d'avoir été si gentilles avec moi. J'ai fait de mon mieux pour vous traiter avec respect et délicatesse et vous me l'avez bien rendu.



XOXO, Débo

Table des matières

Remerciements **5**

Table des matières **17**

Table des figures **21**

Table des tableaux **22**

Abréviations **23**

Introduction **25**

CHAPITRE I - Le développement placentaire **27**

1. De la fécondation à l'implantation 27
2. La placentation 29
   - 2. A Stade pré-villeux 29
   - 2. B Stade Villeux 31
   - 2. C La différenciation trophoblastique 33
   - 2. D Remodelage des artères spiralées utérines 35
3. Similitudes entre les développements placentaire et tumoral 39
   - 3. A La fusion cellulaire 39
   - 3. B La prolifération 39
   - 3. C L'invasion 43
4. Modèle du placenta murin 45
   - 4. A Gestation chez la souris 45
   - 4. B Placentas murin et humain 47
   - 4. C Invasion trophoblastique murine et humaine 47
   - 4. D Zone d'échanges fœto-maternels murine et humaine 47

CHAPITRE II - Les pathologies de la grossesse **49**

1. Les pathologies tumorales de la grossesse 49
   - 1. A Les Moles Hydatiformes 51
     - 1.A.a Présentation clinique 51
     - 1. A.b Les différents types de MH 53
     - 1. A.c Incidence 57
     - 1. A.d Les facteurs de risques 59
     - 1. A.e Prise en charge et traitement des MH 61

1. B Le Choriocarcinome gestationnel 61
1. B.a Définition 61
1. B.b Incidence 61
1. B.c Caractéristiques histologiques 63
1. B.d Facteurs de risque 63
1. B.e La prise en charge 63
2. Pathologies non tumorales de la grossesse 65
2. A Placenta Accreta 65
2. A.a Définition 65
2. A.b Facteurs de risques 67
2. A.c Prise en charge et traitement 69
2. B La pré-éclampsie 69
2. B.a Définition 71
2. B.b Présentations cliniques des PE atypiques 71
2. B.c Prise en charge et traitement 71
2. C Le retard de croissance intra-utérin 73
2. C.a Definition 73
2. C.b Epidémiologie 73
2. C.c Etiologie 75

CHAPITRE III - Les inflammasomes 81
1. Fonctionnement des inflammasomes 83
2. Structure des Inflammasomes 85
2. A La superfamille des PRRs 85
2. A.a Les TLRs, CTLs, et RLRs 85
2. A.b La Pyrine et les ALRs 85
2. A.c Les NLRs 87
2. B L' ASC, Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD 91
2. C Les caspases 91
3. Les pathologies liées aux inflammasomes 93
3. A Les principales inflammasomopathies 93
3. B Les pathologies liées à des dérégulations d'expression des inflammasomes 95

4. Focus sur la protéine NLRP7 99
4. A Expression et régulation 99
4. B Rôle dans l'inflammation 101
4. B.a Rôle Pro-inflammatoire de la protéine NLRP7 101
4. B.b Rôle anti-inflammatoire de la protéine NLRP7 101
4. C Rôle de NLRP7 dans le cancer 103
4. D Rôle dans la spermatogénèse 103
4. E Rôle dans l'ovogénèse et l'acquisition de l'empreinte parentale 105
4. F Rôle dans le développement préimplantatoire 107
4. G Rôle dans la placentation 107

Objectif du Projet de thèse 111

Résultats 117
Article 1 119
La protéine NLRP7 joue un rôle critique dans la différenciation trophoblastique et est impliquée dans le retard de croissance intra-utérin
I. Contexte et présentation de la publication 119
II. Résumé des résultats 159
III. Discussion 159

Article 2 163
La protéine NLRP7 est impliquée dans le développement du choriocarcinome *in vitro* et *in vivo*
I. Contexte et présentation de la publication 163
II. Résumé des résultats 211
III. Discussion 211

Conclusions et perspectives 217

Références 229
Bibliographie 231

Annexes **243**

Annexe 1 : Liste des communications scientifiques 245

Annexe 2 : Article 3 251

EG-VEGF maintenance over early gestation to develop a Pregnancy-Induced Hypertension animal model

Annexe 3 : Article 4 261

PROK1 is a new actor in oocyte competence: expression and hormonal regulation throughout late folliculogenesis.

Annexe 4 : Article 5 287

Casein Kinase 2 contributes to trophoblast invasion: physiological and pathological implications.

Résumé du projet **319**

Table des figures

FIGURE 1 - DIAGRAMME DE NOMENCLATURE DE LA GROSSESSE HUMAINE 26
FIGURE 2 - DEVELOPPEMENT PREIMPLANTATOIRE CHEZ L'HUMAIN 26
FIGURE 3 - LE PLACENTA HUMAIN, ASPECT MACROSCOPIQUE ET REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES ECHANGES FŒTO-MATERNELS 28
FIGURE 4 - APPOSITION ET ADHERENCE DU BLASTOCYSTE A LA PAROI UTERINE 28
FIGURE 5 - IMPLANTATION DU BLASTOCYSTE 30
FIGURE 6 - EMBRYON IMPLANTE A LA FIN DU STADE PRE-VILLEUX (13 JPF) 30
FIGURE 7 - SCHEMA DES VILLOSITES CHORIALES A DIFFERENTS STADES DE DEVELOPPEMENT EN COUPE TRANSVERSALE ET LONGITUDINALE 32
FIGURE 8 - SCHEMA DES VILLOSITES TERTIAIRES 32
FIGURE 9 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UNE COUPE LONGITUDINALE DE VILLOSITE TERTIAIRE A LA 6E SA 34
FIGURE 10 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UNE VILLOSITE TERTIAIRE EN COUPE LONGITUDINALE A LA 10 E SA 34
FIGURE 11 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU REMODELAGE DES ARTERES SPIRALEES 36
FIGURE 12 - CHRONOLOGIE DE LA GESTATION MURINE ET HUMAINE 44
FIGURE 13 - ANATOMIES COMPAREES DES PLACENTAS MURIN ET HUMAIN 46
FIGURE 14 - SCHEMA ILLUSTRANT LES ZONES D'ECHANGES FŒTO-PLACENTAIRES HUMAINES ET MURINES 46
FIGURE 15 - CLASSIFICATION DES MALADIES GESTATIONNELLES TROPHOBLASTIQUES 48
FIGURE 17 - CARACTERISTIQUES GENETIQUES DES MOLES HYDATIFORMES 52
FIGURE 18 - HISTOPATHOLOGIE DES MOLES HYDATIFORMES COMPLETES 52
FIGURE 19 - HISTOPATHOLOGIE DES MOLES HYDATIFORMES PARTIELLES 56
FIGURE 20 - HISTOLOGIE DU CHORIOCARCINOME 62
FIGURE 21 - SCHEMA ILLUSTRANT LE DEGRE D'INVASION PLACENTAIRE 64
FIGURE 22 - SCHEMA DE L'ORGANISATION DES ACTEURS DU SYSTEME IMMUNITAIRE 80
FIGURE 23 - SCHEMA DE L'ACTIVATION DES INFLAMMASOMES 82
FIGURE 24 - PRINCIPAUX ACTEURS DU SYSTEME IMMUNITAIRE MOLECULAIRE 84
FIGURE 25 - SCHEMA ILLUSTRANT LA CLASSIFICATION ET LA STRUCTURE DES PROTEINES DE LA SOUS-FAMILLE DES NLRS 86
FIGURE 26 - SCHEMA ILLUSTRANT L'ACTIVATION DE LA VOIE NF-KB PAR LES PRRS 88
FIGURE 27 - ARBRE PHYLOGENETIQUE CONSENSUS DES NLRPS 90
FIGURE 28 - VARIANTS PROTEIQUES DE LA PROTEINE NLRP7 98
FIGURE 29 - SCHEMA CONSENSUS DES ACTIVITES PRO- ET ANTI-INFLAMMATOIRES DE LA PROTEINE NLRP7 100
FIGURE 30 - EXPRESSION RELATIVE DU GENE NLRP7 DANS QUATRE LIGNEES TROPHOBLASTIQUES HUMAINES 210
FIGURE 31 - EXPRESSION RELATIVE DU GENE IL-1B DANS LES LIGNEES TROPHOBLASTIQUES HUMAINES 212
FIGURE 32 - SCHEMA DE CONCLUSION SUR LE ROLE DE LA PROTEINE NLRP7 DANS LES GROSSESSES NORMALES ET PATHOLOGIQUES 218

Table des tableaux

TABLEAU 1 - CLASSIFICATION FIGO DES NEOPLASIES GESTATIONNELLES TROPHOBLASTIQUES.....62
TABLEAU 2 - SYSTEME D'EVALUATION DU SCORE FIGO DES NEOPLASIES GESTATIONNELLES TROPHOBLASTIQUES..... 62
TABLEAU 3 - DEFINITION DES PRE-ECLAMPSIES ATYPIQUES 70

Abréviations

ADNdb	**A**cide **D**ésoxyribo**N**ucléique **d**ouble **b**rin
ALR	**A**bsent In Melanoma (AIM)-**L**ike **R**eceptors
ARN	**A**cide **R**ibo**N**ucléique
ASC	**A**poptosis-associated **S**peck-like protein containing a **C**ARD
ATP	**A**dénosine **T**ri-**P**hosphate
BiMH	**M**ôle **H**ydatiforme **bi**parentale
CAPS	**C**ryopyrin-**A**ssociated **P**eriodic **S**yndrome
CARD	**C**aspase **A**ctivation and **R**ecruitment **D**omain
CC	**C**horio**C**arcinome
CT	**C**yto**T**rophoblastes
CTEV	**C**yto**T**rophoblastes **E**xtra**V**illeux
CTL	**C**-**t**ype **L**ectine Receptors
CTV	**C**yto**T**rophoblastes **V**illeux
CV	**V**illosité **C**horiale
DAMP	**D**amage-**A**ssociated **M**olecular **P**attern
DMRs	**D**ifferentially **M**ethylated **R**egion**s**
DNase	Enzyme de dégradation de l'ADN
dNTPase	Enzyme de clivage des désoxyriboNucléotides Triphosphates
EG-VEGF	**E**ndocrine **G**land derived **V**ascular **E**ndothelial **G**rowth **F**actor
EMT	**T**ransition **E**pithélio-**M**ésenchymateuse
hCG	**H**uman **C**horionic **G**onadotrophin
HTAg	**H**yper**T**ension **A**rtérielle **g**ravidique
IGF	**I**nsulin **G**rowth **F**actor
IL	**I**nter**l**eukine
IVG	**I**nterruption **V**olontaire de **G**rossesse

jpc	**J**our **P**ost-**C**oïtum
jpf	**J**our **P**ost-**F**écondation
kDa	**k**ilo**Da**lton
LRR	**L**eucin **R**ich **R**epeat
MGT	**M**aladies **G**estationnelles **T**rophoblastiques
MH	**M**ôle **H**ydatiforme
MHC	**M**ôle **H**ydatiforme **C**omplète
MHP	**M**ôle **H**ydatiforme **P**artielle
NGT	**N**éoplasie **G**estationnelle **T**rophoblastique
NLR	**N**ucleotid Oligomerization Domain (NOD)-**L**ike **R**eceptors
NLRP7	**N**ucleotid Oligomerization Domain **L**eucin **R**ich and **P**yrin domain **7**
NF-κB	**N**uclear **F**actor **k**appa **B**
NLS	**D**omaine **de L**ocalisation **N**ucléaire
PAMP	**P**athogen-**A**ssociated **M**olecular **P**attern
PE	**P**ré-**é**clampsie
PRRs	**P**attern **R**ecognition **R**eceptor**s**
RCIU	**R**etard de **C**roissance **I**ntra-**U**térin
RLR	**R**etinoic acid Inducible Gene 1 (RIG1)-**L**ike **R**eceptors
ROS	**R**eactiv **O**xygen **S**pecies
SA	**S**emaines d'**A**ménorrhée
SCMC	**S**ub-**C**ortical **M**aternal **C**omplex
SG	**S**emaines de **G**rossesse
ST	**S**yncytio**t**rophoblaste
TLR	**T**ool-**l**ike **R**eceptors

Introduction

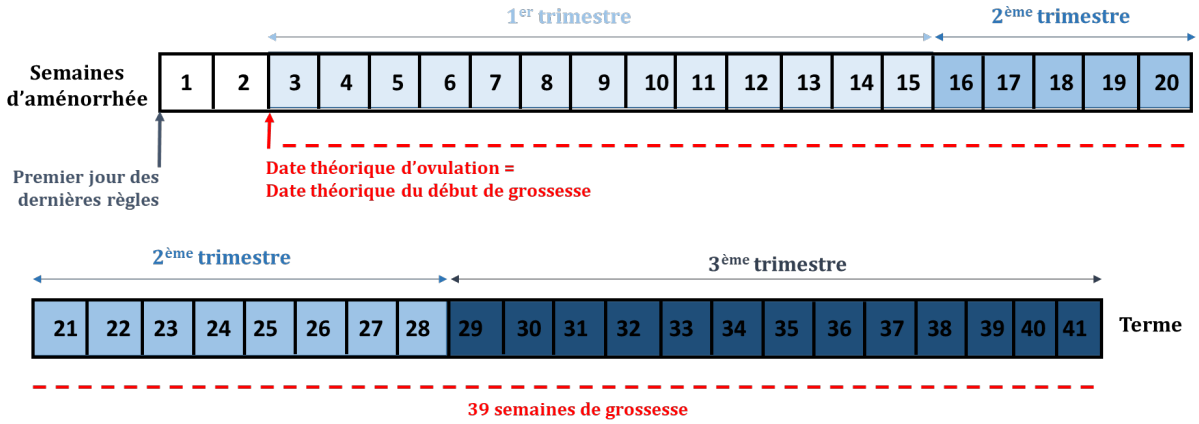


Figure 1 - Diagramme de nomenclature de la grossesse humaine

La grossesse humaine dure 39 semaines et le terme est exprimé en nombre de semaines d'aménorrhées. La durée de la grossesse est subdivisée en trois trimestres.

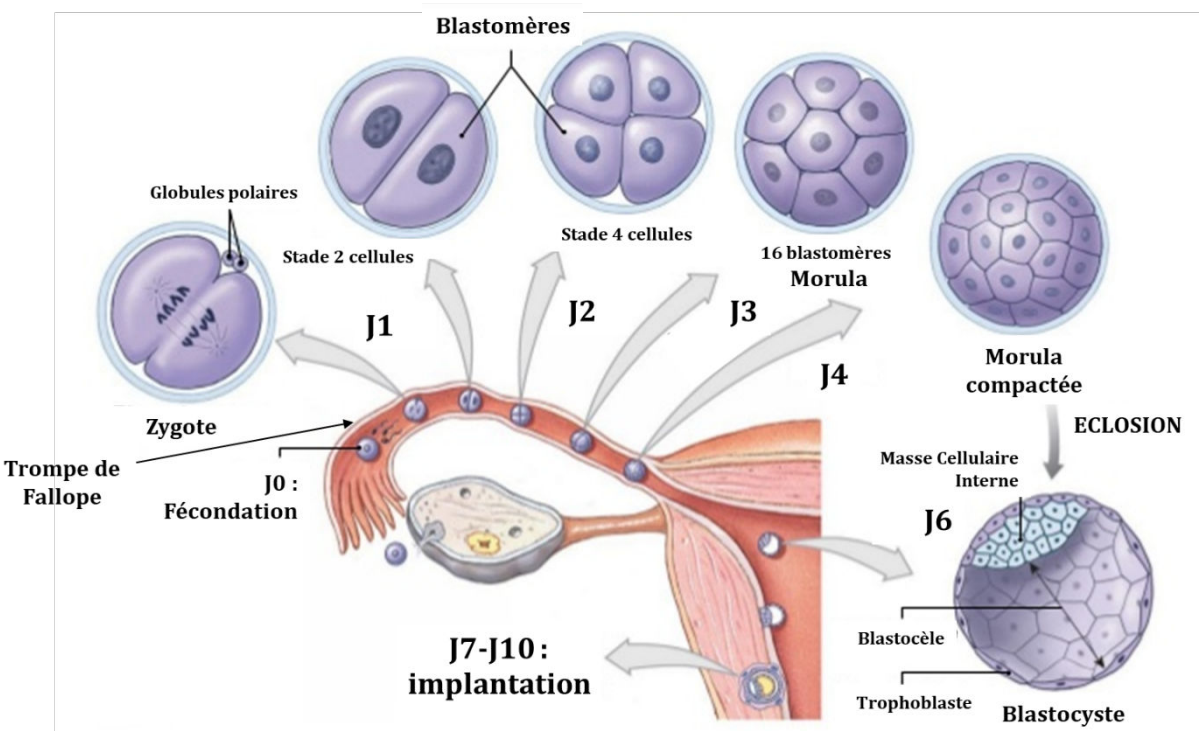


Figure 2 - Développement préimplantatoire chez l'humain

Figure adaptée de http://exxamm.com Copyright © 2013 Pearson Education, Inc.

La fécondation de l'ovocyte se produit dans la trompe de Fallope et les premières divisions du zygote surviennent au cours de son trajet dans celle-ci. L'embryon arrive dans la cavité utérine au stade blastocyste, 6 jours après la fécondation. La phase d'implantation se déroule du 7e au 10e jour post fécondation.

CHAPITRE I

Le développement placentaire

Le temps nécessaire au développement d'un fœtus varie grandement en fonction des espèces. Chez l'Homme, il s'écoule environ 39 semaines entre la fécondation de l'ovocyte et la naissance du fœtus. La date de la fécondation étant purement théorique, l'unité de mesure obstétricale s'exprime en nombre de semaines d'aménorrhée (SA). Le terme « aménorrhée » signifiant absence de menstruation, il s'agit donc du nombre de semaines depuis le premier jour des dernières menstrues (figure 1).

Il existe un décalage de deux semaines entre le terme exprimé en nombre de semaines de grossesse (SG) et le nombre de SA, correspondant à la période entre le premier jour des menstrues et la date théorique de la fécondation (figure 1). La grossesse peut également être subdivisée en trimestres. Elle en compte trois : le premier s'achevant à la 15e SA, le second à la 28e SA et pour finir le troisième court de la 28e à la naissance.

1. De la fécondation à l'implantation

Comme illustré sur la figure 2, la fécondation de l'ovocyte par le spermatozoïde se produit au sein d'une des deux trompes de Fallope dans les 48 heures suivant l'ovulation et forme le zygote. Celui-ci se divise de manière asynchrone au cours de sa progression dans la trompe, à des intervalles de temps de plus en plus courts, pour former un embryon qui n'augmente pas de taille. En effet, l'embryon est contraint par la présence de la zone pellucide, gangue glycoprotéique, qui l'entoure. Il entre dans la cavité utérine au 4e jour post-fécondation (jpf), au stade morula compactée, et y demeure libre et autonome jusqu'au 6e jpf.

Au 5e jpf, la compaction des blastomères est maximale et la première phase de différenciation cellulaire débute. Les cellules du pourtour de l'embryon se différencient en trophoblastes pour former le trophectoderme qui constituera les structures extra-embryonnaires dont le placenta. Les cellules du centre forment la *masse cellulaire interne* ou *bouton embryonnaire* à l'origine de l'embryon. Une cavité remplie de liquide, le *blastocèle,* se forme au sein de l'embryon ; débute alors le stade blastocyste. Le blastocyste va grossir en taille jusqu'à l'éclosion, moment à partir duquel il sera dépourvu de sa zone pellucide (figure 2) et pourra s'accoler à l'endomètre maternel, tissu sécrétoire qui tapisse la cavité utérine.

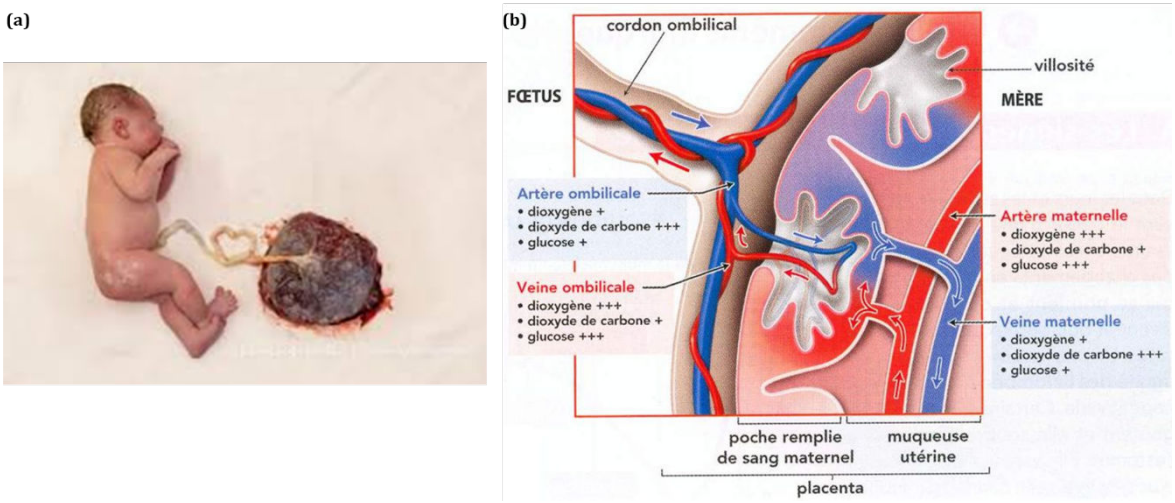


Figure 3 - Le placenta humain, aspect macroscopique et représentation schématique des échanges fœto-maternels

Figure adaptée de https://co-naitre.org et https://slideplayer.fr (Bréal)

(a) *Aspect macroscopique du placenta humain. Le cordon ombilical connecte physiquement le fœtus à la mère. (b) Représentation schématique des échanges fœto-maternels. L'oxygène et les nutriments arrivent dans la chambre intervilleuse par les artères maternelles et diffusent à travers la barrière placentaire pour atteindre les vaisseaux fœtaux. A l'inverse, les déchets produits par le fœtus diffusent depuis la circulation fœtale vers la chambre intervilleuse.*

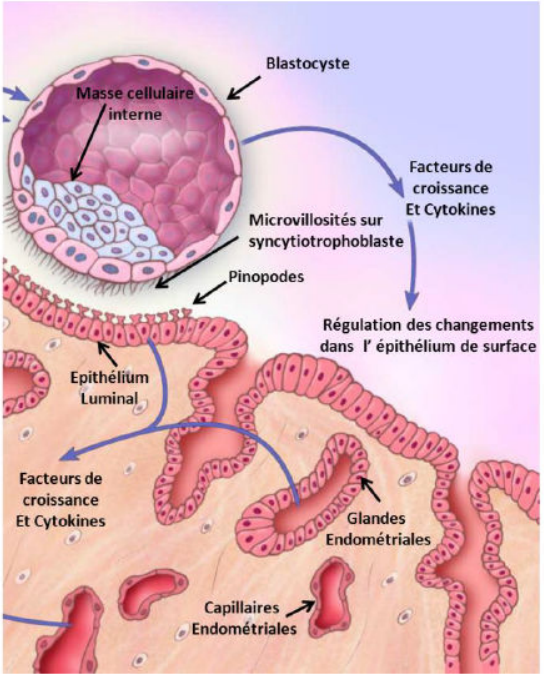


Figure 4 - Apposition et adhérence du blastocyste à la paroi utérine

Figure adaptée de Norwitz, 2001.

Les microvillosités à la surface apicale des cellules du trophectoderme s'entrecroisent avec les pinopodes de la surface apicale des cellules épithéliales de l'endomètre. Ces modifications cellulaires sont soumises à des régulations fines. Ces régulations sont assurées par des facteurs de croissance et de cytokines sécrétés à la fois par le blastocyste et les glandes utérines.

Au 8e jpf, l'embryon a épuisé l'intégralité de ses réserves nutritives. A ce stade, une étroite interaction avec la décidue maternelle commence pour former à partir du trophectoderme un organe nourricier transitoire, *le placenta*.

2. La placentation

Le placenta est un organe extraordinaire qui, comme illustré sur la figure 3-(a), connecte physiquement le fœtus à la mère. Il assure pour l'embryon puis le fœtus de multiples fonctions illustrées en figure 3-(b), telles que la nutrition, l'oxygénation, l'élimination des déchets mais également la synthèse et la sécrétion d'hormones (Aplin, 1991). Le placenta est indispensable au développement de l'embryon ainsi qu'au maintien de la grossesse.

Chez les primates et d'autres espèces comme les rongeurs, le placenta est un organe richement vascularisé. Il est de type hémochorial, les villosités placentaires sont en contact direct avec le sang maternel sans qu'il n'y ait de mélange avec le sang fœtal. La placentation humaine est caractérisée par une invasion précoce et profonde de la décidue maternelle par les trophoblastes. Cette invasion est finement régulée dans le temps et dans l'espace. L'invasion trophoblastique débute dès la 3e SA, soit au 7e jpf, et se poursuit jusqu'à la 14e SA. Elle est dite interstitielle, car l'endomètre se referme derrière l'embryon et s'arrête au tiers supérieur du myomètre. L'invasion trophoblastique est spécifiquement dirigée vers les artères utérines (Aplin, 1991).

La mise en place du placenta humain se définit par les deux stades suivants : le *stade pré-villeux*, du 6e au 13e jpf, et le *stade villeux*, du 13e jpf à la naissance.

2. A Stade pré-villeux

Le stade pré-villeux comprend deux phases principales : l'*implantation* de l'embryon et la mise en place de la circulation utéro-placentaire, appelée *stade lacunaire*.

L'implantation

Au 6e jpf, le blastocyste, extrait de la zone pellucide, vient s'accoler à la paroi utérine lors d'un processus nommé *apposition*. Les trophoblastes faisant face à l'endomètre forment des microvillosités à leur pôle apical. Celles-ci viennent s'entrecroiser avec les pinopodes formés à la surface apicale de l'épithélium utérin (figure 4). Le blastocyste et l'endomètre mettent en place une communication étroite par l'intermédiaire de facteurs de croissance et de cytokines qui assurent l'adhérence du blastocyste et la réceptivité endométriale (Norwitz, 2001).

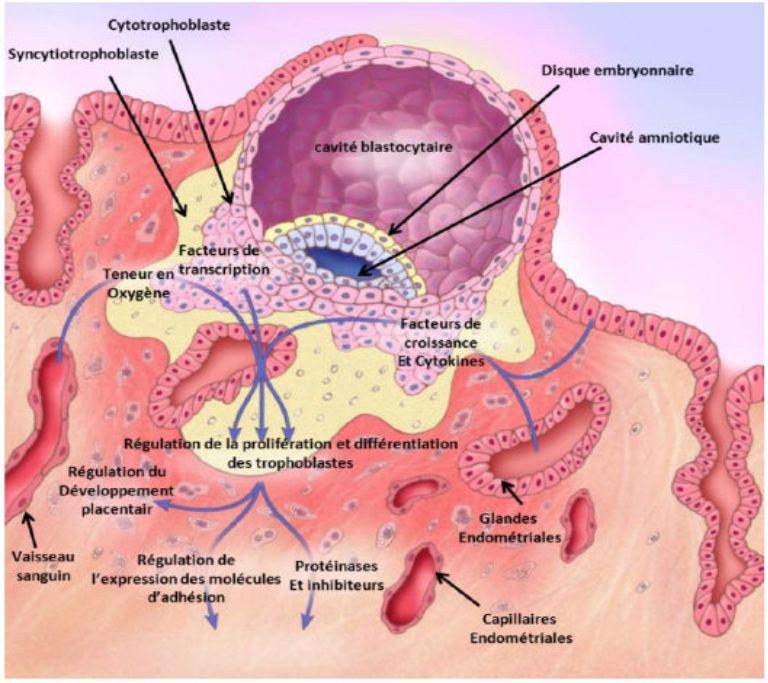


Figure 5 - Implantation du blastocyste

Figure adaptée de Norwitz, 2001.

Le trophectoderme se différencie en deux types cellulaires : le syncytiotrophoblaste et les cytotrophoblastes. Le syncytiotrophoblaste, unité endocrine du placenta, est un tissu multinucléé issu de la fusion des cytotrophoblastes. Les cytotrophoblastes forment des colonnes qui poussent le syncytiotrophoblaste dans la muqueuse utérine. Ce processus est régulé par de nombreux paramètres tels que la tension en oxygène, l'expression de facteurs de transcription, la sécrétion de protéases, de facteurs de croissance et de cytokines.

Figure 6 - Embryon implanté à la fin du stade pré-villeux (13 jpf)

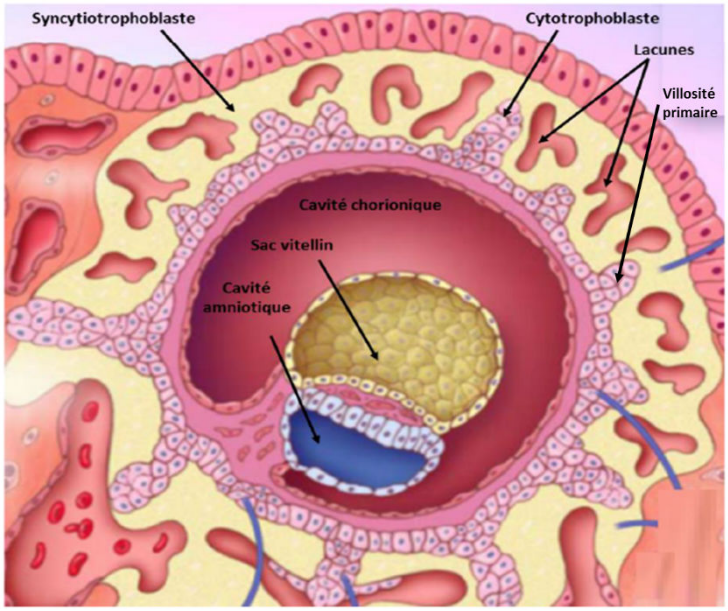


Figure adaptée de Norwitz, 2001.

L'embryon a envahi la muqueuse utérine et l'épithélium utérin est refermé. L'embryon est entouré de tissu syncytiotrophoblastique contenant des lacunes remplies de sang maternel. Les cytotrophoblastes s'organisent en colonnes formant les villosités primaires.

Au niveau de la zone de contact, une assise cellulaire externe multinucléée se différencie pour former le *Syncytiotrophoblaste* (ST). Le ST est l'unité endocrine du placenta, capable de sécréter différentes hormones, dont la Gonadotrophine Chorionique humaine (hCG), principale hormone de la grossesse. Une assise cellulaire plus interne constituée de *cytotrophoblastes* (CT) prolifératifs se différencie également. Hautement invasif à ce stade, le blastocyste crée une brèche dans l'épithélium utérin puis l'envahit progressivement sous l'influence de différents tropismes tels qu'illustrés sur la figure 5.

Stade lacunaire

Le stade lacunaire commence entre le 8e et le 9e jpf. Le ST érode l'endomètre et les vaisseaux maternels et laisse apparaitre des lacunes en son sein. Ces lacunes se remplissent de sang maternel, mettant en contact direct les cellules trophoblastiques et les composants sanguins de la mère (figure 6). La circulation utéro-placentaire débute alors avec la mise en place de ces toutes premières zones d'échanges entre la mère et l'embryon.

2. B Stade Villeux

Les villosités choriales constituent l'unité structurelle et fonctionnelle du placenta. La période d'élaboration placentaire correspond au développement des villosités choriales. Elle commence dès le stade lacunaire au 13e jpf et se poursuit jusqu'à la fin du 4e mois. Dès le 5e mois, l'architecture placentaire est constituée. Son développement se poursuit par l'élongation de ses villosités choriales et la croissance du système vasculaire intravillositaire. Il s'agit de la période dite *stationnaire* (Mihu, 2009).

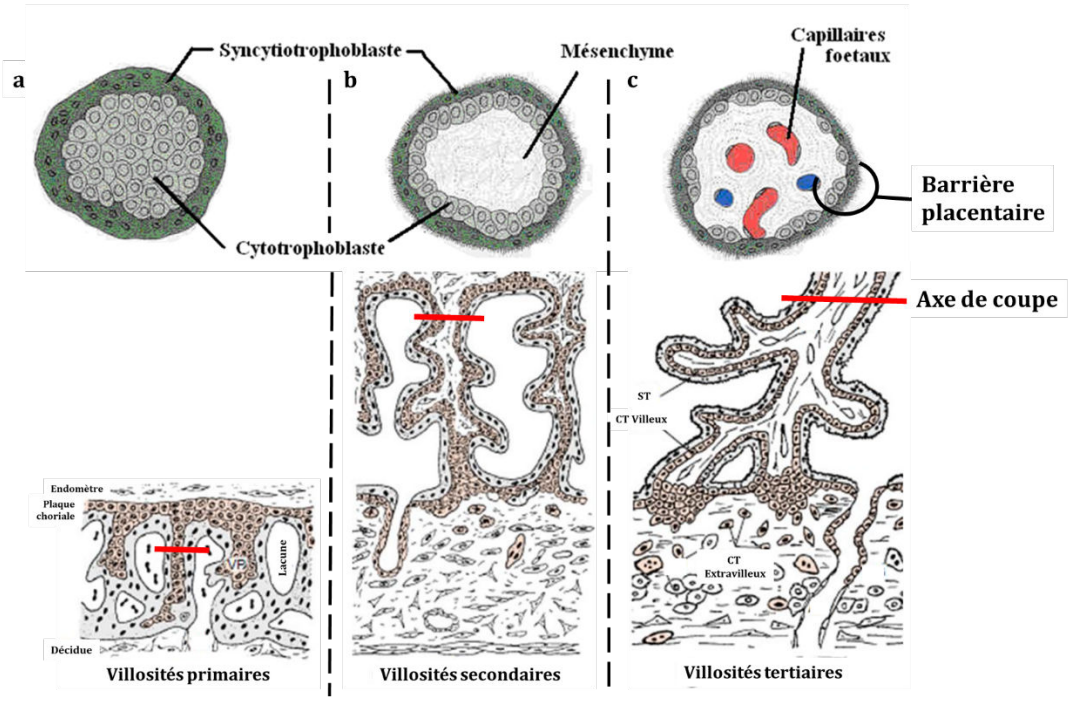


Figure 7 - Schéma des villosités choriales à différents stades de développement, en coupe transversale et longitudinale

Figure adaptée de Bernirsk, 2000 et http://www.md.ucl.ac.be

*(**a**) Coupe transversale et longitudinale d'une villosité primaire. La villosité primaire est bordée de syncytiotrophoblaste et remplie de cytotrophoblastes. (**b**) Coupe transversale et longitudinale d'une villosité secondaire. La villosité est bordée d'une couche de syncytiotrophoblaste externe et d'une monocouche de cytotrophoblastes internes. La villosité est remplie de mésenchyme. (**c**) Coupe transversale et longitudinale d'une villosité tertiaire. La villosité est toujours bordée des deux couches de tissus trophoblastiques et le mésenchyme se différencie pour former les vaisseaux fœtaux. Ligne rouge : axe de la coupe.*

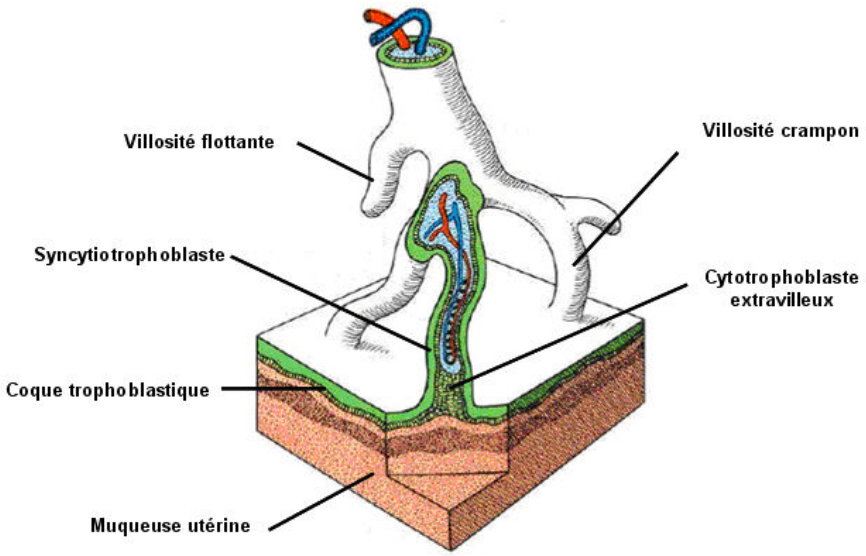


Figure 8 - Schéma des villosités tertiaires

Figure adaptée de Guibourdenche, congrès GynAzur 2017.

On distingue deux types de villosités tertiaires. Les villosités flottantes, libres dans l'espace intervilleux et les villosités crampons ancrées dans la muqueuse utérine.

L'élaboration placentaire

La formation des structures villositaires débute dès le stade lacunaire. Les CT deviennent hautement prolifératifs et forment des excroissances qui poussent les travées de ST, induisant une invasion plus profonde au sein de la paroie utérine. A ce stade, les villosités ne sont composées que de trophoblastes, on parle alors de *villosités primaires* (figure 6 et 7-**a**).

A partir du 16e jpf, les villosités se remplissent de mésoblaste extra-embryonaire. Elles se transforment ainsi en *villosités secondaires* (figure 7-**b**).

Au 21e jpf, le système circulatoire de l'embryon se met en place. Le mésoblaste extra-embryonnaire se différencie en tissu conjonctif qui sera à l'origine de vaisseaux sanguins ; le processus de vasculogénèse est alors engagé. Les néovaisseaux formés se connectent à ceux de l'embryon à partir de la 5e SA (Demir, 1989). Les villosités différenciées contenant les vaisseaux fœtaux sont dénommées *villosités tertiaires* (figure 7-**c**).

A partir de ce stade, les échanges fœto-placentaires se font à travers 4 couches de tissus : ***i)*** l'endothélium des capillaires fœtaux, ***ii)*** le tissu conjonctif de l'axe villositaire, ***iii)*** le cytotrophoblaste et ***iv)*** le syncytiotrophoblaste. L'ensemble de ces 4 éléments forme la *barrière placentaire*.

On distingue alors deux types de villosités : les villosités ancrées dans la muqueuse utérine, appelées *villosités crampons*, et les villosités libres dans les chambres intervilleuses, dénommées *villosités flottantes* (figure 8).

2. C La différenciation trophoblastique

Au sein des villosités flottantes, les CT dits villeux (CTV) tapissent la villosité choriale. Ils prolifèrent modérément et fusionnent pour donner le ST, couche cellulaire externe en contact direct avec le sang maternel.

Au niveau des villosités crampons, les CT peuvent soit fusionner et former le ST, soit former des colonnes de CT extravilleux (CTEV) à la base de ces villosités (Cross, 1994).

Les cytotrophoblastes villeux

Les villosités choriales sont formées d'un axe mésenchymateux entourant les vaisseaux fœtaux et sont bordées d'une couche cellulaire interne de CTV (figure 7-**c**). Ce sont des cellules épithéliales mononucléées qui reposent sur une lame basale. En fusionnant, ces cellules permettent le renouvellement continu du syncytiotrophoblaste car celui-ci ne présente pas d'activité mitotique (Huppertz, 2004).

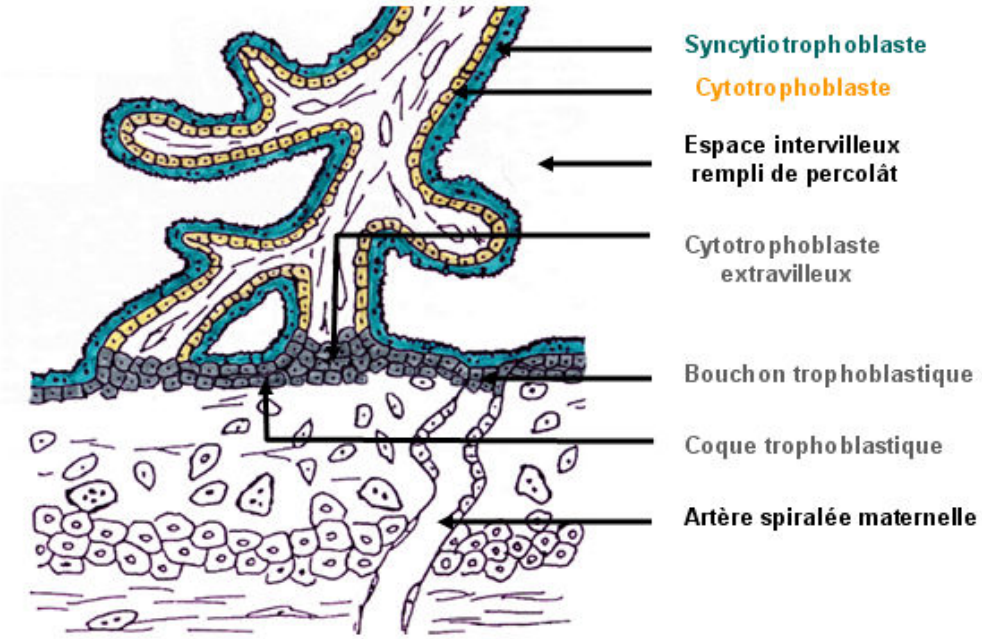


Figure 9 - Représentation schématique d'une coupe longitudinale de villosité tertiaire à la 6e SA

Figure adaptée de Fournier, 2007

Les villosités choriales sont bordées d'une couche externe de syncytiotrophoblastes et d'une couche interne de cytotrophoblastes. Les cytotrophoblastes proximaux de la villosité sont hautement prolifératifs et forment une coque trophoblastique recouvrant l'ensemble de la face maternelle du placenta.

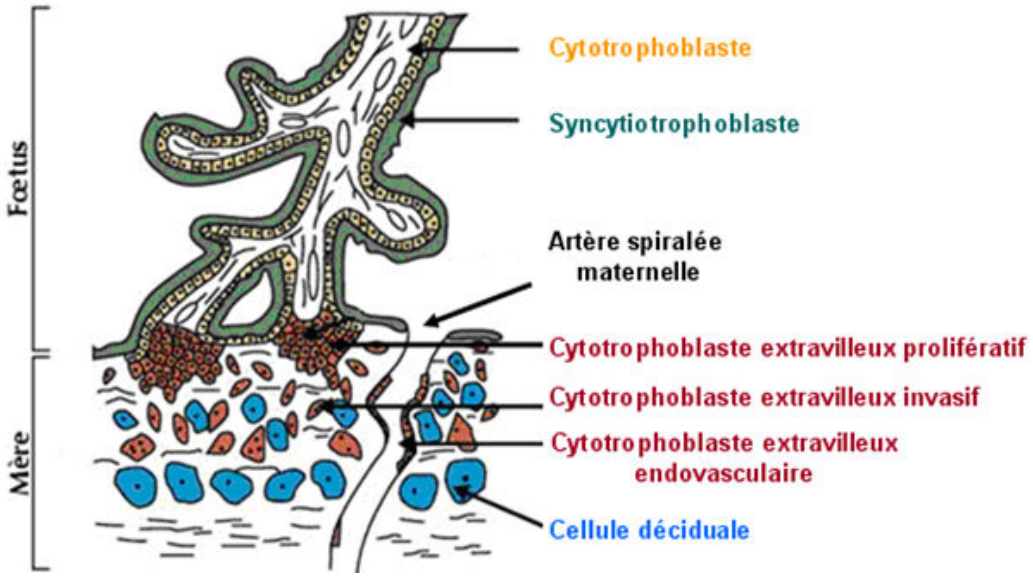


Figure 10 - Représentation schématique d'une villosité tertiaire en coupe longitudinale à la 10e SA

Figure daptée de Fournier, 2007

Les villosités choriales sont bordées d'une couche externe de syncytiotrophoblaste et d'une couche interne de cytotrophoblaste. La coque trophoblastique a progressivement disparu et les trophoblastes proximaux acquièrent un caractère invasif. Ils envahissent à la fois la décidue maternelle et les vaisseaux spiralés maternels. Ils y remplacent les cellules endothéliales afin de remodeler la paroi vasculaire et maximiser l'apport de sang oxygéné dans l'espace intervilleux.

Le syncytiotrophoblaste

Issu de la fusion des CT, le ST est en contact direct avec le sang maternel. Cette caractéristique lui confère un phénotype de cellules endothéliales notamment sur le plan de la régulation de l'hémostase dans la chambre intervilleuse (Jones, 1991).

Le ST assure les échanges d'oxygène, de nutriments et de déchets métaboliques entre la mère et le fœtus (Eaton, 1993). D'autre part, il constitue l'unité endocrine du placenta. Il synthétise et sécrète de nombreuses hormones telles que la progestérone, les œstrogènes, l'hCG ainsi qu'un grand nombre de facteurs de croissance, de cytokines et neuropeptides impliqués dans le développement fœtal et placentaire (Ogren, 1994). Il est aussi impliqué dans le phénomène de tolérance immunitaire de la grossesse (Benirschke, 2013).

Les cytotrophoblastes extravilleux

Entre la 5e et la 10e SA, les CTEV vont proliférer dans la région proximale de l'axe villositaire et venir s'intercaler entre le ST et la muqueuse utérine. Ils recouvrent ainsi l'ensemble de la surface maternelle du placenta et forment une coque trophoblastique (figure 9).

La coque trophoblastique va rapidement former des bouchons trophoblastiques qui obstruent les artères spiralées utérines, empêchant ainsi l'afflux de sang maternel fortement oxygéné dans l'espace intervilleux. Grâce à la filtration du sang maternel par ces bouchons, seul un percolât dépourvu de cellules sanguines remplit cet espace. Il permet de maintenir les villosités trophoblastiques dans un environnement physiologique relativement hypoxique jusqu'à la fin du premier trimestre de la grossesse (Burton, 2002). Aussi, les CTEV de la coque trophoblastique vont proliférer et se différencier pour envahir les artères spiralées utérines. L'invasion peut se faire selon deux modes. Selon le premier mode, les CTEV dits endovasculaires migrent en suivant la lumière des artères spiralées et remplacent progressivement les cellules endothéliales ; lors du second mode, les CTEV dits interstitiels envahissent la muqueuse utérine jusqu'au premier tiers du myomètre et érodent les parois des artères spiralées par l'extérieur (Kaufmann, 2003).

2. D Remodelage des artères spiralées utérines

Aux alentours de la 10e SA, les bouchons trophoblastiques s'ouvrent progressivement et la coque trophoblastique commence à disparaitre. Ce phénomène provoque un afflux progressif de sang maternel dans l'espace intervilleux (Burchell, 1967). Au même moment, les CTEV se différencient pour initier le processus d'invasion des artères spiralées utérines (figure 10). Ce processus, strictement contrôlé dans le temps et dans l'espace, nécessite la mise en œuvre de mécanismes bien contrôlés par les CTEV.

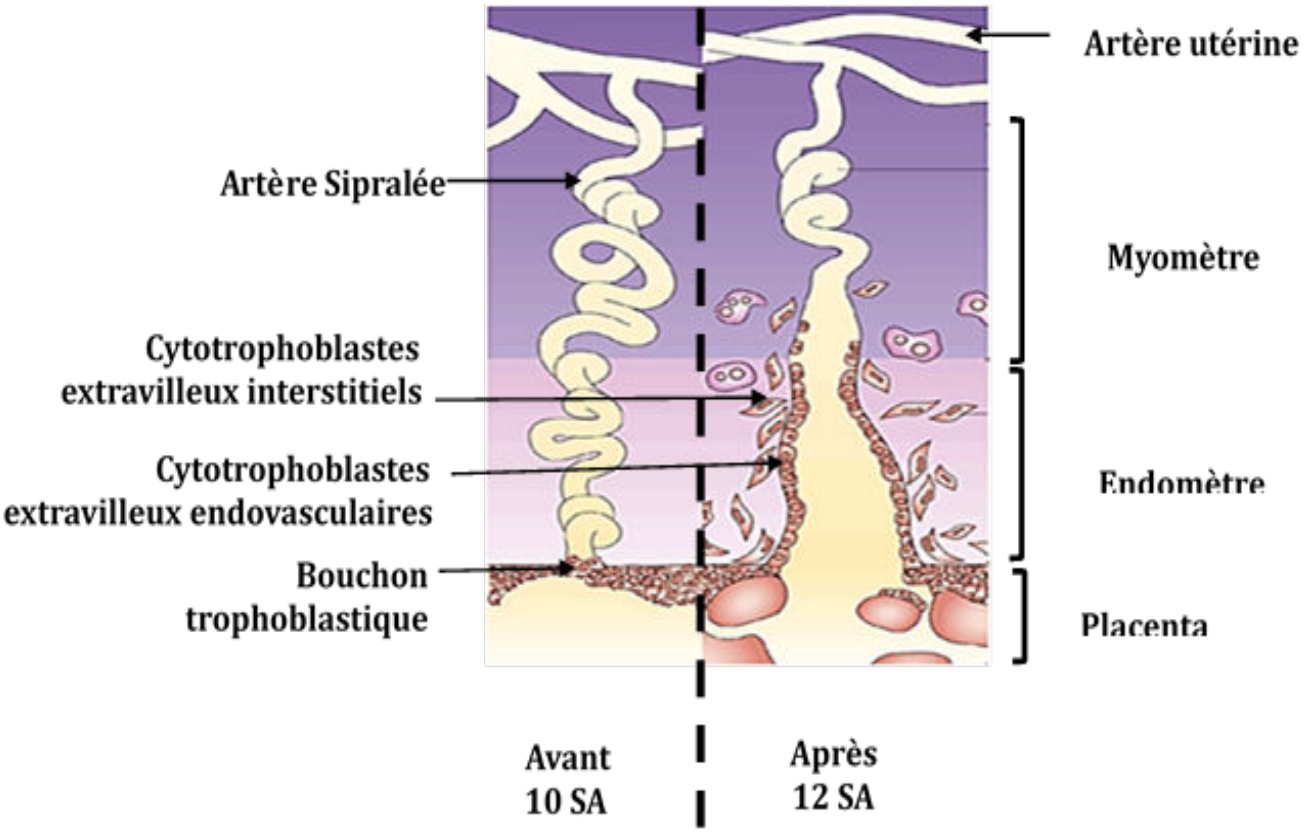


Figure 11 - Représentation schématique du remodelage des artères spiralées

Figure Adaptée de http://www.nature.com

Avant la 10e SA, les artères spiralées utérines sont obstruées par les bouchons trophoblastiques. La chambre intervilleuse est donc remplie d'un percolât de sang maternel faiblement oxygéné ; il s'agit de la période d'hypoxie placentaire. Entre la 10e et la 12e SA, les bouchons trophoblastiques disparaissent et les cytotrophoblastes invasifs interstitiels et endovasculaires remodèlent les parois vasculaires en remplaçant les cellules endothéliales. Ce remodelage vasculaire permet la transformation des artères spiralées utérines en vaisseaux de haut débit et faible résistance induisant un apport important de sang oxygéné au placenta.

Ces cellules vont adhérer à la matrice extracellulaire, la digérer localement puis migrer au sein des zones digérées.

Dans un premier temps, le remodelage vasculaire est initié au niveau local par la modification de l'endothélium des artères spiralées. Il présente une infiltration de leucocytes et une vacuolisation des cellules endothéliales ainsi qu'une désorganisation et une hypertrophie des cellules musculaires lisses au pourtour des vaisseaux (Harris, 2010). Les CTEV endovasculaires vont alors acquérir un véritable phénotype endothélial en exprimant diverses protéines d'adhésion (Zhou, 1997). Ils engagent un véritable mimétisme moléculaire pour maximiser l'invasion et la destruction des segments distaux des artères spiralées utérines (figure 11) (Zhou, 1997).

Le remodelage de la paroi vasculaire est caractérisé par : ***i)*** un remplacement des cellules endothéliales par les CTEV endovasculaires, ***ii)*** une paroi artérielle œdémateuse et ***iii)*** une destruction des tuniques musculaire et élastique interne des vaisseaux qui sont remplacées par un tissu fibreux. La paroi vasculaire est alors atone et insensible aux éléments vasoactifs. Ce phénomène garantit un débit sanguin constant dans l'espace intervilleux (Harris, 2007). La modification des caractéristiques d'élasticité des artères spiralées permet leur transformation en vaisseaux dilatés de haut débit et de faible résistance ainsi que la mise en place de la circulation fœto-placentaire avec pour conséquence l'oxygénation placentaire. Le remodelage vasculaire doit impérativement s'opérer de manière optimale à la fin du 1er trimestre de la grossesse afin d'en assurer la progression normale (Zhou, 1997).

Tout défaut dans l'invasion trophoblastique est associé au développement de pathologies de la grossesse (Kaufmann, 2003 ; Louwen, 2012). Dans le cas d'une invasion trop superficielle des vaisseaux maternels, le placenta est maintenu dans un environnement hypoxique anormal en raison d'un faible débit de perfusion placentaire. Ce phénomène pourrait conduire au développement de pathologies graves comme la pré-éclampsie (PE) et le retard de croissance intra-utérin (RCIU) (Kaufmann, 2003). A l'inverse, une invasion excessive des trophoblastes au-delà de leur limite physiologique est observée dans les cas de maladies gestationnelles trophoblastiques, en particulier dans le cas du choriocarcinome gestationnel (Louwen, 2012).

3. Similitudes entre les développements placentaire et tumoral

Le développement placentaire physiologique et le développement tumoral présentent de nombreuses similitudes. Les principales correspondent aux propriétés cellulaires communes suivantes : la fusion (Bastida-Ruiz, 2016), le haut degré de prolifération, l'absence d'inhibition de contact ainsi que leurs propriétés invasives et migratoires.

L'immunotolérance (Beaman, 2017), l'angiogenèse (Zhao, 2014), l'utilisation accrue du glucose ou encore l'inflammation activée dans les deux cas (Soeters, 2013) sont aussi des processus communs des développements placentaire et tumoral.

Ces caractéristiques ont conduit certains auteurs à qualifier le tissu trophoblastique de tissu « pseudo-malin » formant des métastases physiologiques contrôlées (Mullen, 1998 ; Redman, 1997).

3. A La fusion cellulaire

La fusion cellulaire est un processus physiologique qui se produit lors de la fécondation, du développement des muscles striés squelettiques, de l'ossature, du cerveau, du foie mais également du placenta (Lu, 2009 ; Vignery, 2005 ; Gentric, 2014 ; Benirschke, 2013). Ce processus cellulaire implique le rapprochement et la fusion des membranes plasmiques de cellules conduisant à la fusion des cytoplasmes et à la création d'une nouvelle cellule multinucléée (Aguilar, 2013). Ce phénomène est indispensable au bon développement du placenta et au maintien de la grossesse. Il est impliqué dans l'élaboration et le renouvellement du syncytiotrophoblaste (Benirschke, 2013). Des altérations de la fusion cellulaire au cours de la grossesse ont été associées au développement de pathologies de la grossesse, telle que la pré-éclampsie (Lee, 2001 ; Langbein, 2008).

Le phénomène de fusion trophoblastique fait intervenir deux protéines, appelées syncytine 1 et syncytine 2 (Mi, 2000 ; Blond, 1999). Ces protéines sont des glycoprotéines codées par des gènes d'enveloppe d'origine rétrovirale. Le génome humain compte environ 8 % de gènes d'origine rétrovirale mais la plupart de ces régions ne sont pas traduites. Les Syncytines font partie des gènes rétroviraux traduits dans le placenta humain (Rote, 2003). La syncytine 1 était dénommée protéine de l'enveloppe HERV- W (Mi, 2000) et la syncytine 2 protéine de l'enveloppe HERV-FRD (Blaise, 2003). Ces deux protéines de l'enveloppe étaient connues pour leur implication dans les processus de fusion cellulaire.

Il a été proposé que la capture des gènes codants pour ces deux protéines se serait produite au cours de l'évolution chez les mammifères euthériens et que ces évènements auraient permis l'évolution et l'émergence de la structure placentaire.

L'implication directe de la syncytine 1 dans la fusion des trophoblastes et dans le développement placentaire a été mise en évidence par l'invalidation de son expression dans des cytotrophoblastes en culture primaire. Cette invalidation a causé une diminution significative de la fusion des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblastes (Frendo, 2003). De plus, l'invalidation de la syncytine–A chez la souris, protéine équivalente de la syncytine 1 chez l'humain, a des conséquences critiques sur l'issue de la gestation. Les embryons homozygotes pour la délétion meurent in utero à mi-gestation (Dupressoir, 2005). Le rôle de syncytine 2 dans ce processus a été mis en évidence par la surexpression de cette protéine dans différentes lignées trophoblastiques. Cette surexpression a induit une fusion importante des cellules trophoblastiques (Blaise, 2003).

De manière intéressante, l'expression des deux protéines clés de la différentiation trophoblastique, les syncytines 1 et 2, a été mise en évidence dans différentes lignées tumorales (endométriale, ovarienne, mammaire, lymphoïde, etc.) (Strissel, 2012) et certaines études ont démontré que c'est par leur biais que les cellules tumorales exercent leur capacité de fusion (Strick, 2007). Par ailleurs, le phénomène de fusion cellulaire a été décrit comme un acteur clé de la progression tumorale (Lu, 2009). De nombreuses études ont démontré que les cellules tumorales ont la capacité de fusionner avec différents types de cellules normales tels que les cellules stromales, épithéliales ou immunitaires. Ce phénomène participe au développement de l'hétérogénéité des tumeurs (Mohr, 2015). En fusionnant, les cellules partagent leurs propriétés respectives. Une des conséquences associées à la fusion des cellules tumorales avec d'autres types cellulaires, notamment les macrophages, serait l'acquisition d'un caractère métastatique (Lu, 2009). Il a été démontré que ce phénomène de polyploïdisation des cellules tumorales est source d'une évolution très rapide des tumeurs solides (Coward, 2014). A noter que cette grande capacité d'évolution peut être à l'origine du développement de résistance aux traitements anti-tumoraux (Rajagopalan, 2003). Dans ce contexte, un certain nombre de pressions de sélection vont conduire à un déséquilibre du développement des tumeurs en faveur des cellules les plus résistantes et agressives. C'est pourquoi certains auteurs suggèrent l'importance de compléter les traitements actuels par des stratégies de blocage de l'évolution tumorale et donc de la fusion cellulaire (Coward, 2014).

3. B La prolifération

Comme les cellules cancéreuses, les cytotrophoblastes villeux ont un taux de prolifération très élevé. Celle-ci est régie par des voies de signalisation particulières. Certaines sont communes aux cellules tumorales comme celles activées par l'Insulin *Growth Factor* 1 (IGF) ou par le *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF).

Dans les trophoblastes, lorsque l'IGF se lie à son récepteur IGF1R, il stimule la prolifération via l'activation de la voie des MAPKinases et la survie cellulaire par l'intermédiaire de la voie PI3Kinase (Forbes, 2009). Dans les cellules cancéreuses, la voie de l'IGF est de surcroît mitogène et anti-apoptotique. Elle est aussi impliquée dans la protection des cellules cancéreuses contre les agents de chimiothérapie et les effets des radiations (Tao, 2007). Cependant, à la différence des cellules cancéreuses, la prolifération très active des trophoblastes est limitée dans le temps. En effet, celle-ci est maximale entre la 5e et la 10e SA correspondant à la période d'hypoxie placentaire (Burton, 2002).

Le développement en condition hypoxique est une autre caractéristique commune aux développements placentaire et tumoral. Parmi les changements métaboliques induits par l'hypoxie, on retrouve la surexpression et la stabilisation du facteur de transcription *Hypoxia-Inducible Factor* (HIF) qui permet l'activation de la transcription de ses gènes cibles, dont le facteur de croissance VEGF et son récepteur VEGFR1. Plusieurs études ont démontré le rôle du VEGF dans le contrôle de la prolifération des cellules endothéliales irriguant la tumeur, mais aussi celle des cellules endothéliales micro-vasculaire intravillositaire supportant toute la croissance de la villosité au cours du premier trimestre de la grossesse (Athanassiades, 1998 ; Devery, 2015), du remodelage vasculaire (Shibuya, 2011) et de l'invasion trophoblastique (Zhou, 1997).

3. C L'invasion

Au cours du développement tumoral et lors de la placentation, l'invasion des tissus environnants est un processus indispensable (Binker, 2009). Alors que les cellules cancéreuses envahissent un tissu donné puis métastasent dans des sites secondaires, les trophoblastes suivent un processus organisé avec une prolifération et une invasion finement contrôlées dans le temps et dans l'espace.

Différents phénomènes sont à l'origine de l'acquisition du phénotype invasif par ces cellules tels que la modification du panel des protéines d'adhésion cellulaire exprimées, la synthèse et la sécrétion de protéases ainsi que la sensibilité aux facteurs de croissance (Vicovac, 1996 ; Yang, 2008). A titre d'exemple, il a été démontré que les trophoblastes (Vicovac, 1996) et les cellules cancéreuses (Yang, 2008) perdent l'expression de l'E-cadhérine et changent leur répertoire d'intégrines. Ceci leur permet de perdre leur polarité cellulaire et d'acquérir une motilité plus importante. Il a également été démontré que ces cellules sécrètent des protéases dont les métalloprotéases qui leur permettent de dégrader la matrice extracellulaire et faciliter l'invasion tissulaire (Binker, 2009).

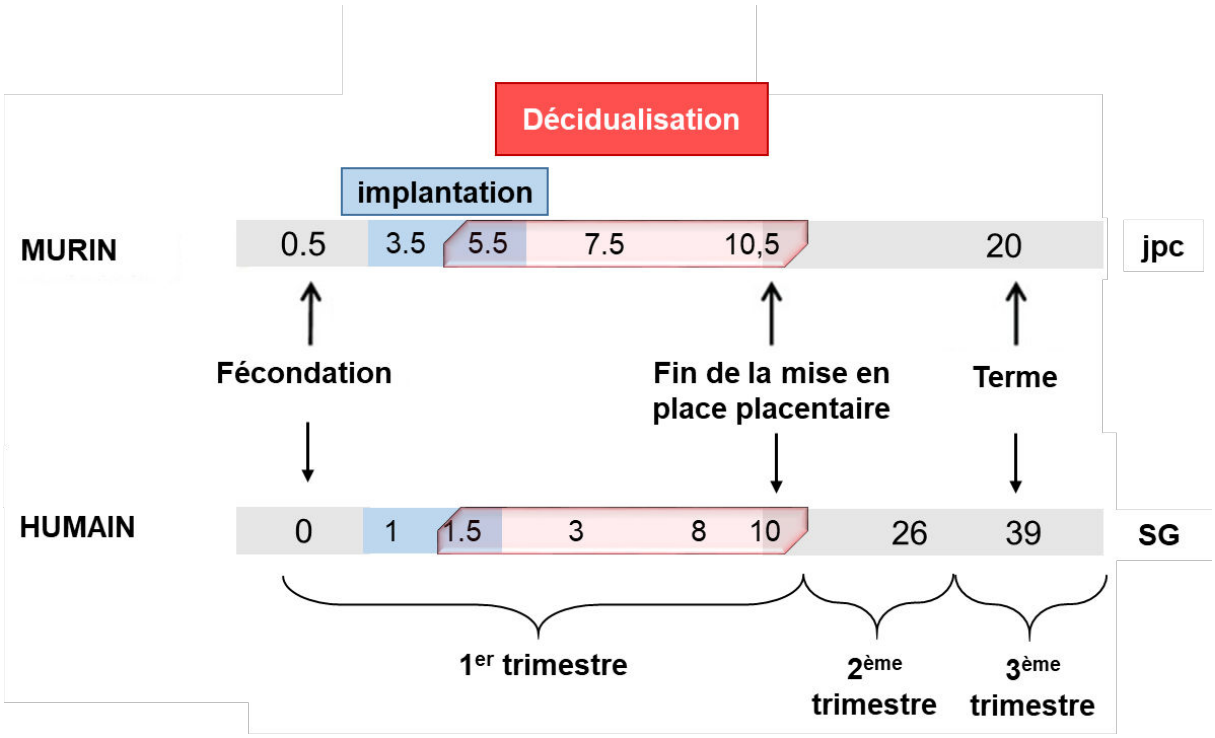


Figure 12 - Chronologie de la gestation murine et humaine

Inspirée de Sones, 2016

Chez la souris, l'implantation débute au 3,5e jour post-coïtum (jpc) et la mise en place placentaire s'achève à 10,5 jpc, correspondant à la fin du premier trimestre chez la femme. La durée de la gestation chez la souris est de 20 jours en moyenne contre 39 semaines chez la femme.

4. Modèle du placenta murin

La souris constitue le modèle d'étude *in vivo* le plus couramment utilisé en laboratoire (enquête statistique 2016 ; Ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation ; France). Dans le contexte de l'étude des mécanismes physiopathologiques de la grossesse *in vivo*, le modèle murin présente de nombreux avantages. En effet, les placentas humain et murin partagent de fortes similarités structurelles et fonctionnelles (Georgiades, 2002). Ces deux espèces présentent une placentation de type hémochorial où le sang maternel, charrié par les artères spiralées utérines remodelées, est au contact direct des structures trophoblastiques fœtales (Maltepe, 2010). L'utilisation de ce modèle présente plusieurs avantages dont les possibilités de suivre toute la gestation jusqu'au terme, d'étudier les différentes étapes de la placentation et d'exploiter une grande quantité de matériel biologique (7 à 14 unités fœto-placentaires indépendantes par portée).

4. A Gestation chez la souris

La fécondation chez la souris est estimée par la présence du bouchon vaginal au matin correspondant à un terme de 0,5 jour post-coïtum (jpc). La gestation dure en moyenne 20 jours et la portée est constituée de 7 à 14 souriceaux. C'est entre 10 et 12 jpc que la grossesse devient observable grâce à l'augmentation de taille de l'abdomen et de poids chez la souris.

Comme illustré sur la figure 12, la phase d'implantation des embryons survient entre 3,5 et 5,5 jpc et la phase de mise en place du placenta s'effectue jusqu'à 10,5 dpc, correspondant à la fin du premier trimestre de la grossesse humaine (Sones, 2016).

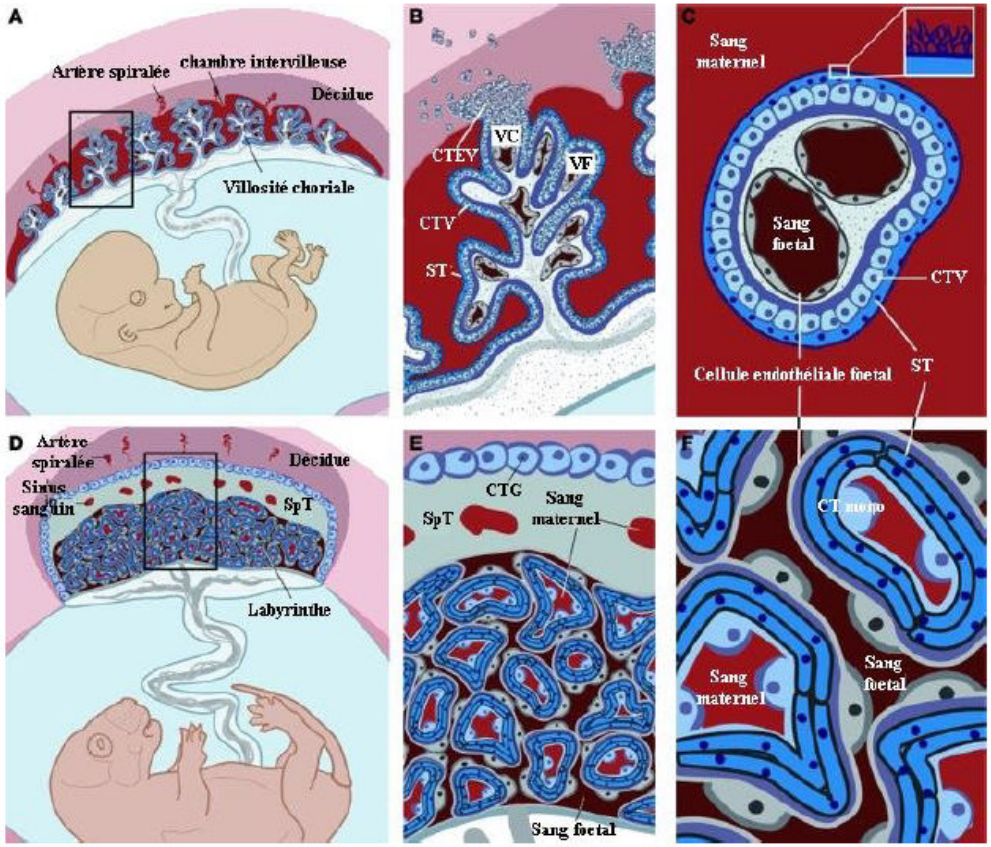


Figure 14 - Schéma illustrant les zones d'échanges fœto-placentaires humaine et murine

Figure adaptée de Maltepe, 2010.

***A-C**. Le placenta humain. **B**. Zoom sur une villosité choriale. **C**. Coupe transversale d'une villosité flottante. **D-F**. Placenta murin. **E**. Zoom sur la zone labyrinthique. **F**. Grossissement du labyrinthe. CT mono : Cytotrophoblaste mononucléé ; CTEV : cytotrophoblaste extravilleux ; CTG : Cellule Trophoblastique Géante ; CTV : cytotrophoblaste villeux ; SpT : Cellules progénitrices des CTG ; ST : Syncytiotrophoblaste ; VC : villosité crampon ; VF : Villosité flottante.*

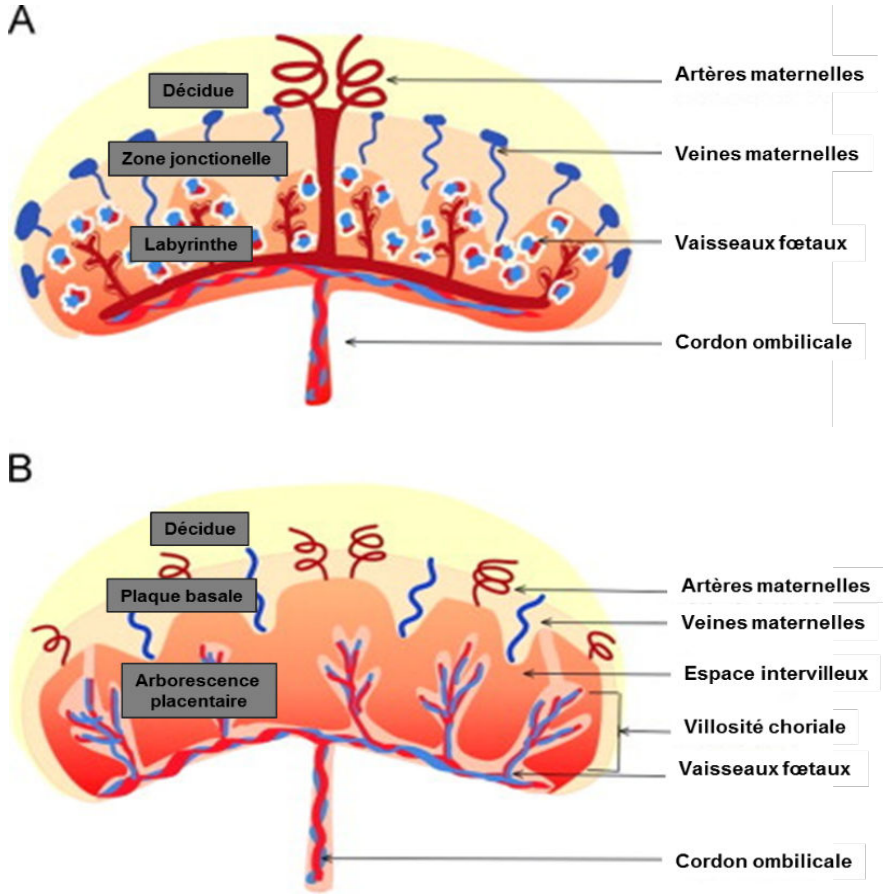


Figure 13 - Anatomies comparées des placentas murin et humain

Figure adaptée de Rai & Cross, 2014.

***A**. Le placenta murin est composé de trois zones : **i)** la décidue maternelle, contient les artères spiralées utérines qui se réunissent au centre du placenta en un canal artériel unique distribuant le sang dans les vaisseaux labyrinthiques maternels. **ii)** La zone jonctionnelle, unité endocrine du placenta murin. Elle contient les cellules trophoblastiques géantes invasives et les cellules à glycogène. **iii)** le labyrinthe, correspond à la zone où se produisent les échanges fœto-maternels. Il est constitué d'un réseau dense de vaisseaux fœtaux séparés du sang maternel par trois couches de cellules trophoblastiques. **B**. Le placenta humain est composé de trois zones : **i)** la décidue maternelle qui renferme les artères spiralées utérines. **ii)** la plaque basale qui constitue une séparation entre la face maternelle et la face fœtale. **iii)** l'arborescence placentaire qui baigne dans l'espace intervilleux remplie de sang maternel.*

4. B Placentas murin et humain

Le placenta dérive du trophectoderme et est constitué, chez ces deux espèces, d'une face maternelle et d'une face fœtale. Le placenta murin, illustré sur la figure 13-A, est composé de 3 zones anatomiques : ***i)*** la décidue maternelle qui dérive de la muqueuse utérine et contient les vaisseaux sanguins maternels notamment les artères spiralées qui assurent la circulation utéroplacentaire. ***ii)*** la zone jonctionnelle, composée principalement des cellules à glycogène et des cellules trophoblastiques géantes. Elle constitue l'unité endocrine du placenta murin et enfin ***iii)*** le labyrinthe, composé d'un enchevêtrement de vaisseaux maternelles et de capillaires fœtaux séparés par trois feuillet de cellules trophoblastiques (Rai, 2014). Le placenta humain est composé de trois zones analogues (figure 13-B), bien que l'arborescence placentaire humaine présente une densité inférieure au labyrinthe murin.

4. C Invasion trophoblastique murine et humaine

Chez la souris, les trophoblastes invasifs sont représentés par les cellules trophoblastiques géantes (TGC) qui envahissent la muqueuse utérine et initient la transformation de la décidue maternelle (Ramathal, 2010). Une fois la mise en place placentaire achevée, les TGC procèdent au remodelage des artères spiralées utérines (Blois, 2011 ; Cross, 2002 ; Adamson, 2002). Le développement embryonnaire précoce chez la souris se déroule aussi en condition hypoxique et c'est le remodelage vasculaire par les cellules trophoblastiques qui permet la mise en place de la circulation fœto-maternelle. Cependant, il est important de noter que chez la souris l'invasion trophoblastique interstitielle est moins profonde que chez l'humain. En effet, l'invasion est maximale au niveau de la zone jonctionnelle et n'atteint jamais le myomètre.

4. D Zones d'échanges fœto-maternelles murine et humaine

Sur le plan fonctionnel, les deux zones d'échanges sont analogues avec pour fonction d'assurer la diffusion des gaz, nutriments et déchets entre la mère et le fœtus. Cependant, tandis que la placentation humaine est dite hémo-monochoriale c'est-à-dire que l'espace intervilleux est bordé d'une fine couche de ST (figure 14 – B et C). La placentation murine est dite hémo-trichoriale car les capillaires fœtaux sont isolés du sang maternel par trois couches de cellules trophoblastiques. En effet, comme représenté sur le panneau F de la figure 14, les vaisseaux fœtaux sont recouverts de deux couches de ST puis d'une fine couche de trophoblastes mononuclés (Maltepe, 2010).

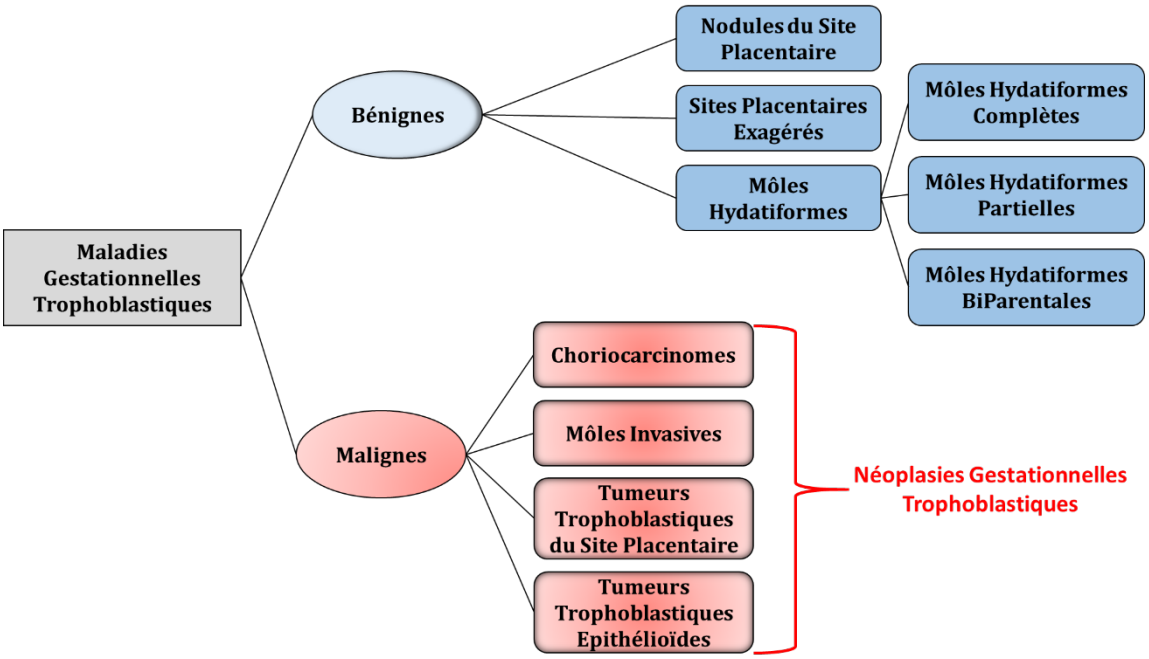


Figure 15 - Classification des maladies gestationnelles trophoblastiques

Figure inspirée de Stevens, 2015.

Les maladies gestationnelles trophoblastiques bénignes comptent les nodules du site placentaire, les sites placentaires exagérés et les différents types de môles hydatiformes. Les maladies gestationnelles trophoblastiques malignes, appelées néoplasies gestationnelles trophoblastiques comprennent le choriocarcinome, les môles invasives, les tumeurs trophoblastiques du site placentaire et les tumeurs trophoblastiques épithélioïdes.

CHAPITRE II

Les pathologies de la grossesse

Selon l'enquête « Opinion-Way » ordonnée par la Fondation Prem'Up en 2003, les grossesses pathologiques représentent 1 grossesse sur 5 en France (PremUP/Opinion Way, 2003). Le spectre des pathologies pouvant survenir durant la grossesse est très large et présente dans tous les cas un risque de mortalité et de morbidité important pour la mère et l'enfant.

Il est largement admis que les causes des principales pathologies de la grossesse s'initient très précocement au cours de la grossesse, bien avant l'apparition des symptômes cliniques (Roberts, 2017). Ainsi, la majorité des études s'intéresse à la fenêtre de 8 à 20 SA, période pendant laquelle les modifications développementales vasculaires et métaboliques ont lieu.

Bien que nous soyons en mesure de contrôler certaines des pathologies de la grossesse comme le diabète gestationnel ou l'hypertension artérielle gravidique (HTAg), d'autres pathologies comme les maladies gestationnelles trophoblastiques (MGT), le retard de croissance intra-utérin (RCIU) et la pré-éclampsie (PE) représentent encore un défi médical face à l'absence de traitement et où la délivrance placentaire reste la seule issue.

A ce jour, la compréhension des mécanismes sous-jacents impliqués dans le développement de ces pathologies est un enjeu scientifique majeur. Les travaux de recherche actuels visent particulièrement à améliorer la prise en charge de ces pathologies et à prévenir leur apparition.

1. Les pathologies tumorales de la grossesse

Les MGT sont des complications rares de la grossesse conduisant au développement de tumeurs placentaires vascularisées et invasives ayant toutes pour marqueur commun un taux d'hormone hCG très élevé (Shrivastava, 2014). Comme illustré sur la figure 15, cette famille est composée de diverses pathologies trophoblastiques allant des tumeurs bénignes précancéreuses (les nodules du site placentaire, les sites placentaires exagérés et les môles hydatiformes) aux tumeurs gestationnelles trophoblastiques malignes appelées *néoplasies gestationnelles trophoblastiques* (NGT), comprenant le choriocarcinome (CC), les môles invasives, les tumeurs trophoblastiques du site placentaire et les tumeurs trophoblastiques épithélioïdes (Froeling, 2014).

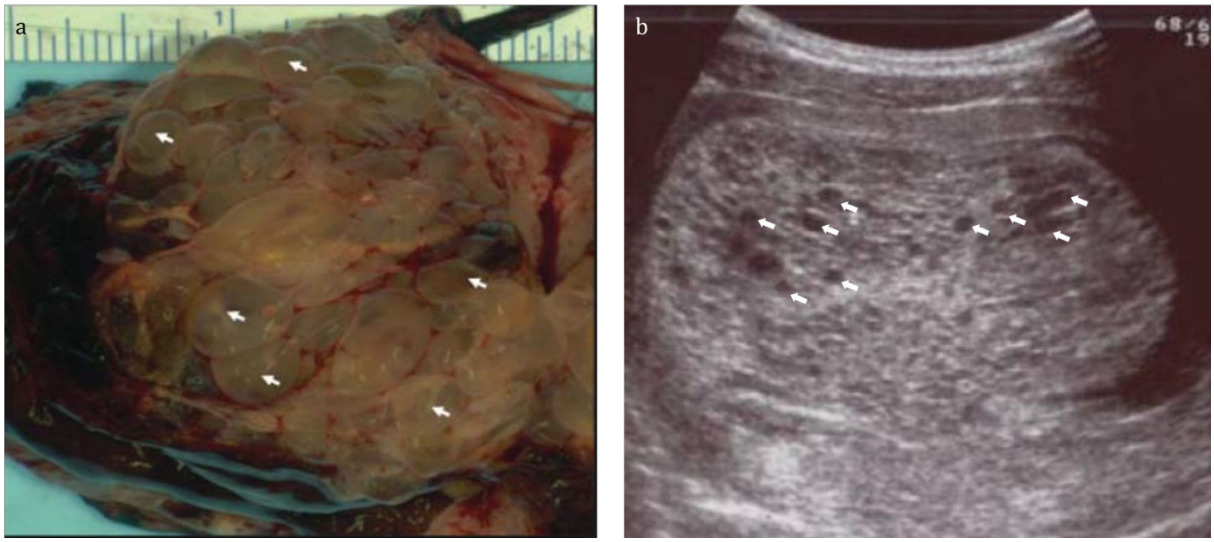


Figure 16 - Aspect macroscopique et échographique d'une môle hydatiforme complète

Figure adaptée de Slim, 2017 et Golfier, 2010.

*(**a**) Aspect macroscopique d'une môle hydatiforme complète. Les flèches mettent en évidence les vésicules kystiques. (**b**) Aspect échographique d'une môle hydatiforme complète. Les flèchent mettent en évidence les structures en « grappe de raisin » caractéristiques des môles.*

1. A Les Môles Hydatiformes

Les môles hydatiformes (MH) sont des pathologies de la grossesse appartenant à la famille des MGT. Il s'agit de tumeurs trophoblastiques bénignes caractérisées par une hyperplasie du trophoblaste avec une dégénérescence hydropique des villosités (figure 16-a) (Golfier, 2010). La première description clinique de ces pathologies remonte à 400 av. J-C par Hippocrate qui décrit la présence de vésicules intra-utérines.

1.A.a Présentation clinique

Les manifestations précoces des MH sont : un taux très élevé d'hormone hCG (principale hormone de la grossesse sécrétée par le placenta) par rapport à l'âge gestationnel, des saignements vaginaux, une sensation de lourdeur dans le bas ventre, un élargissement trop important de l'utérus pour le terme et parfois une hyperémèse gravidique.

L'ensemble de ces symptômes étant très courant au 1er trimestre de la grossesse, les MH ne sont généralement découvertes qu'à la première échographie. Elles ont une présentation échographique typique avec des structures hyperéchogènes ayant un aspect de tempête de neige ou de grappe de raisin associées ou non à la présence de structures embryonnaires (figure 16-b) (Sebire, 2001).

Les MH avancées sont plutôt rares dans les pays dits développés grâce au diagnostic précoce. Néanmoins, une évolution tardive des môles peut induire des saignements vaginaux importants suivis ou non d'une expulsion spontanée de la môle et/ou même d'une rupture utérine (Slim, 2017).

D'autres manifestations cliniques peuvent survenir chez les patientes. On retrouve l'hyperthyroïdie (Amir, 1984) et des hyperstimulations ovariennes induisant des kystes lutéaux en raison de la dérégulation du taux d'hCG (Osathanondh, 1986). Des cas fréquents de PE ont aussi été rapportés (Ramsey, 1998 ; Ditisheim, 2015) (*cf.* Chapitre II.2.A PE). Ces manifestations cliniques sont plus observées dans les pays en voie de développement.

La suspicion de MH peut être renforcée après l'échographie et l'évaluation du taux de β-hCG, par une évaluation du taux d'hormone thyroïdienne ou même la mise en évidence radiographique d'emboles pulmonaires ou d'épanchement pleural (Slim, 2017). Cependant, seule l'analyse histopathologique du produit de fécondation permet d'établir le diagnostic.

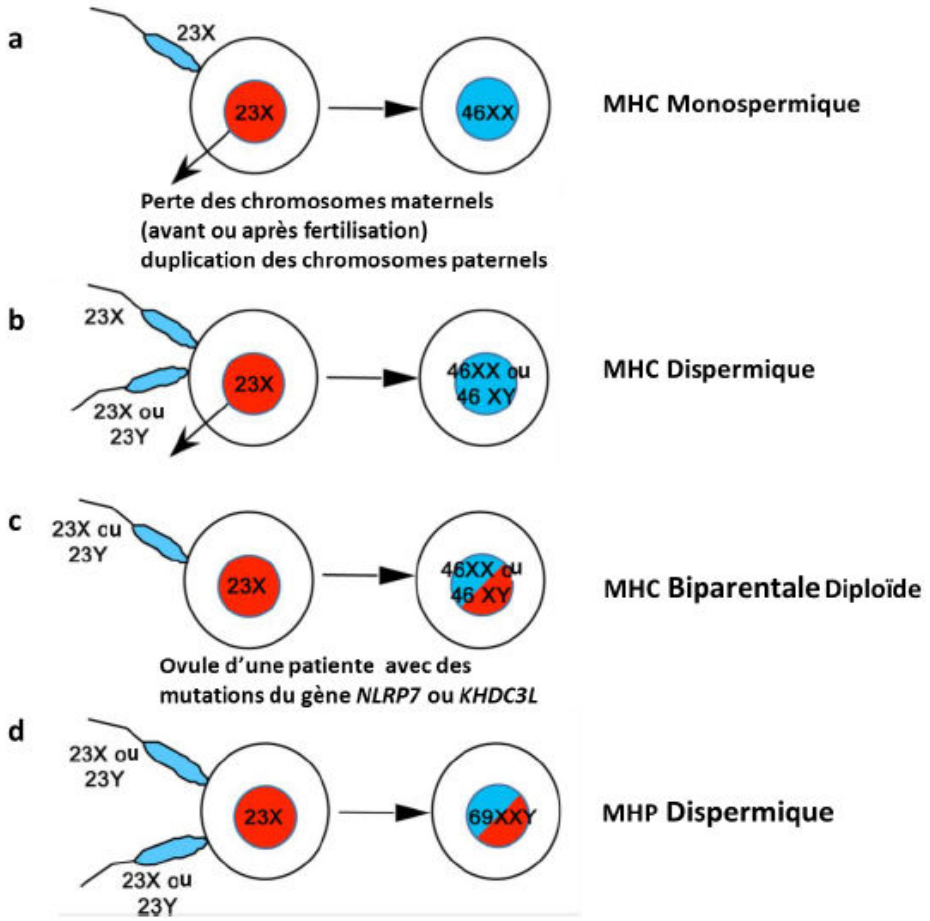


Figure 17 - Caractéristiques génétiques des môles hydatiformes

Figure adaptée de Froeling, 2014.

*Les môles hydatiformes complètes sont issues de la fécondation monospermique (**a**) ou dispermique (**b**) d'un ovocyte énucléé ou perdant son pronucléus après fécondation. Les môles hydatiformes biparentales sont issues de la fécondation monospermique d'un ovocyte porteur d'une mutation des gènes NLRP7 ou KHDC3L. Enfin les môles hydatiformes partielles sont issues de la fécondation dispermique d'un ovocyte qui conserve son pronucléus (**d**).*

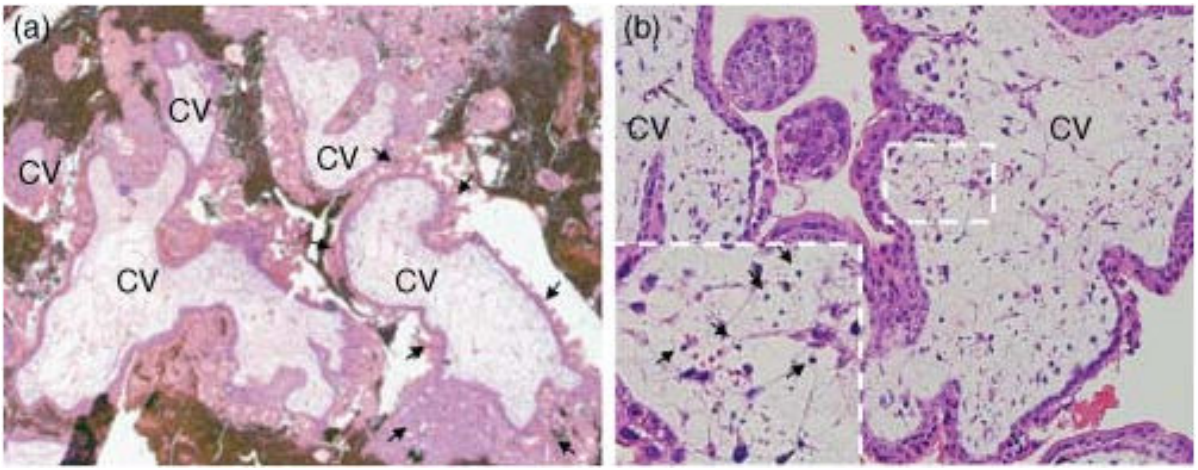


Figure 18 - Histopathologie des môles hydatiformes complètes

Figure adaptée de Slim, 2017.

*(**a**) Coupe histologique d'une môle hydatiforme complète colorée à l'hématoxyline-éosine. Les flèches mettent en évidence une hyperprolifération aléatoire des cytotrophoblastes extravilleux. (**b**) Coupe histologique à un plus fort grossissement. Les flèches mettent en évidence la présence de corps apoptotiques.*
CV : Villosité Choriale.

1. A.b Les différents types de MH

Il existe différents types de môles hydatiformes. Elles sont classées selon des critères génétiques (présence ou absence du matériel génétique maternel) ou histologiques (présence ou absence de tissus embryonnaire). On dénombre trois grands types de MH : les môles hydatiformes complètes (MHC), les môles hydatiformes Biparentales (BiMH) et les môles hydatiformes partielles (MHP).

La genèse de ces môles est due à la surexpression des gènes à empreinte paternelle et à l'absence d'expression des gènes à empreinte maternelle, conduisant à une hyperplasie trophoblastique et un défaut de développement embryonnaire. Les MH sont le résultat d'une fécondation anormale de l'ovocyte conduisant à un produit de conception au caryotype anormal.

Chaque type de môle présente des caractéristiques génétiques qui lui sont propres (figure 17), ces dernières pouvant servir de moyen de diagnostic (Hui, 2017). Il est très important de caractériser le type de môle de chaque patiente car toutes n'ont pas le même risque de dégénérescence maligne (Noal, 2010).

Les Môles Hydatiformes Complètes

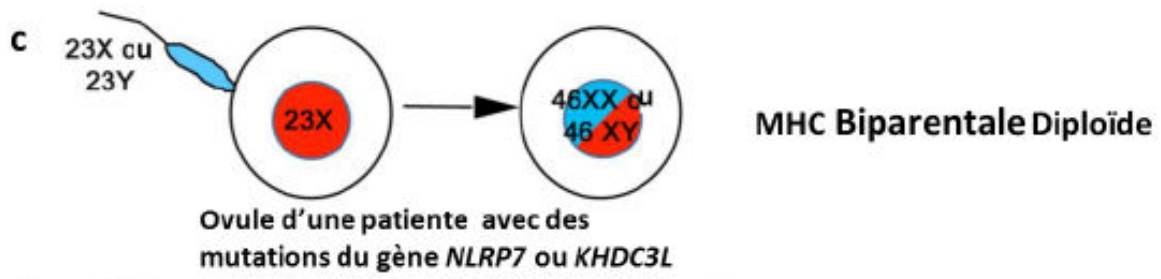
- ⇨ **Caractéristiques génétiques**

Les MHC sont caractérisées par la présence de deux génomes paternels, l'ADN mitochondrial restant maternel (Wallace, 1982). Dans la majorité des cas (85%) le caryotype du conceptus est 46,XX homozygote. Il s'agit d'une fécondation monospermique d'un ovocyte énucléé suivi de la duplication du génome paternel (figure 18-a). En revanche, dans près de 15% des cas le conceptus est 46,XX ou 46,XY hétérozygote, l'ovocyte énucléé a donc été fécondé par deux spermatozoïdes (figure 18-b) (Banet, 2014). Les MHC sont dites diandriques diploïdes.

- ⇨ **Caractéristiques histologiques**

Les caractéristiques histologiques permettant de diagnostiquer les MHC sont essentiellement relevées sur des coupes de villosités chorioniques (CV). Dans les MHC, les villosités sont uniformément kystiques et avasculaires (absence de vaisseaux fœtaux), les cytotrophoblastes extravilleux présentent une hyperprolifération aléatoire non orientée (flèches sur le panneau **a** de la figure 18). On retrouve également un grand nombre de cellules stromales non polarisées chargées de corps apoptotiques (flèches sur le panneau **b** de la figure 18). De plus, les MHC sont dépourvues de tissus embryonnaires (Slim, 2017).

Figure 17-c :


c
23X ou
23Y
23X
46XX ou
46 XY
MHC Biparentale Diploïde
Ovule d'une patiente avec des
mutations du gène *NLRP7* ou *KHDC3L*

- **Caractéristique d'occurence**

La majorité des MHC sont sporadiques. Un certain nombre d'entre elles sont dites récurrentes lorsqu'elles surviennent chez une même patiente. Elles représentent 1,8 % des cas de MHC en Europe (Sebire, 2003). Cette fréquence augmente dans les pays en voie de développement avec un taux maximal rapporté de 9,4 % observé au Maroc (Boufettal, 2011).

Les Môles Hydatiformes Biparentales

Les BiMH sont des formes familiales de MHC. Elles représentent de 0,6 à 2,6 % de tous les cas de MH (Sand, 1984). Elles résultent de la fécondation d'un ovocyte qui conserve son matériel génétique et d'un seul spermatozoïde (figure 17-c). Elles sont diploïdes, leur génome est constitué de 50 % de matériel génétique d'origine paternelle et 50 % d'origine maternelle. La présentation histologique des tissus de la BiMH est identique à celle observée dans les MHC sporadiques (Messaed, 2011).

L'étude de cas familiaux de BiMH a permis d'identifier deux gènes à effet maternel responsables de la genèse de ces pathologies : les gènes *NLRP7* (NOD-Like Receptor Pyrin domain 7) (Murdoch, 2006) et *KHDC3L* (KH Domain 3-Like protein) (Parry, 2011).

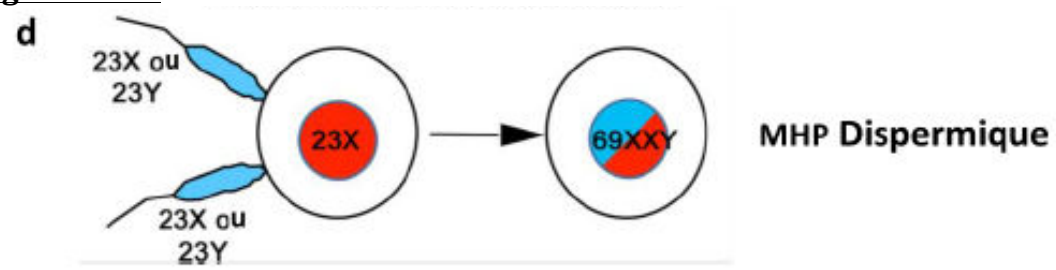
Les mutations du gène *NLRP7* sont responsables de près de 70 % des cas de BiMH, avec des mutations homozygotes ou hétérozygotes composites. Les mutations du gène *KHDC3L* ne sont responsables que de 10 à 15 % des cas (Parry, 2011). A ce jour, 64 variants de *NLRP7* sur les 240 décrits sont pathologiques (Slim, 2017) pour seulement 4 identifiés pour le gène *KHDC3L* (Parry, 2011).

Ces deux gènes à effet maternel sont exprimés dans l'ovocyte où ils jouent un rôle crucial dans l'acquisition de l'empreinte parentale durant l'ovogénèse. Dans les BiHM, les gènes soumis à l'empreinte maternelle ont un profil de méthylation aberrant (Kou, 2008 ; Hayward, 2009 ; Monk, 2017) (cf. Chapitre III.4 – focus sur la protéine NLRP7).

A l'heure actuelle, il est certain que les mutations des gènes *NLRP7 et KHDC3L* sont la cause de la survenue des BiMH. En revanche, les mécanismes par lesquels ces mutations influencent le développement de celles-ci restent encore à élucider. L'étude des dérégulations de l'empreinte parentale associées à ces mutations ainsi que leur conséquence sur l'expression des gènes est actuellement en cours (Hui, 2017).

Il est important de noter que la protéine NLRP7 appartient à la superfamille des protéines NOD-Like Receptors capables de former des inflammasomes (Radian, 2013). Les membres de cette famille ont été décrits comme des régulateurs de l'inflammation intracellulaire.

Figure 17-d :



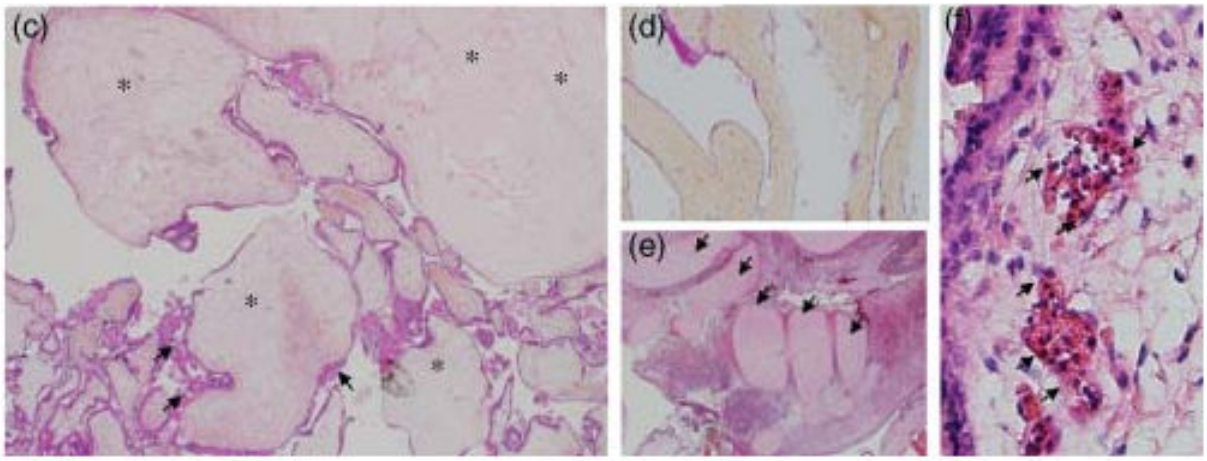


Figure 19 - Histopathologie des môles hydatiformes partielles

Figure adaptée de Slim, 2017.

*Coupe histologique d'une môle hydatiforme partielle colorée à l'hématoxyline-éosine. (**c**) Les astérisques mettent en évidence les villosités choriales œdémateuses et les flèches de rares zones d'hyperprolifération trophoblastique aléatoires. (**d**) Mise en évidence de la présence des membranes fœtales. (**e**) Mise en évidence par les flèches de la présence de tissu cartilagineux fœtal. (**f**) Mise en évidence par les flèches de cellules sanguines nucléées.*

De façon intéressante, la protéine NLRP7 a été rapportée comme une protéine également régulatrice de la prolifération des cellules tumorales (Okada, 2004) et la différenciation trophoblastique (Mahadevan, 2014). Ces données suggèrent que cette protéine pourrait également avoir un rôle propre dans le développement et l'évolution des MGT.

Les Moles Hydatiformes partielles

- ⇨ **Caractéristiques génétiques**

Les MHP se distinguent principalement par leur triploïdie monogynique diandrique. Aucun cas de MHP diploïde n'a été rapporté dans la littérature (Hui, 2017). Elles résultent de la fécondation d'un ovocyte nucléé par deux spermatozoïdes (figure 17-d).

La triploïdie est le principal défaut génétique de la conception. Elle est responsable de près de 8 % des avortements spontanés (Hassold, 1980). Les MHP sont caractérisées par l'existence d'un développement embryonnaire évoluant jusqu'à la fin du premier trimestre et donc par la présence au niveau histologique de deux types de tissus, extra-embryonnaire et embryonnaire.

- ⇨ **Caractéristiques histologiques**

La présence de ces deux tissus facilite le diagnostic histopathologique des MHP. On distingue également deux populations de villosités choriales fibreuses et œdémateuses (figure 19-**c**, astérisques). Il n'existe généralement pas de prolifération aberrante des trophoblastes extravilleux ni de corps apoptotiques. En revanche, on retrouve souvent des tissus embryonnaires, comme les membranes fœtales et du tissu cartilagineux (panneaux **d** et **e**, respectivement). Dans les MHP, les globules rouges nucléés fœtaux sont aussi observés (panneau **f**) (Slim, 2017).

1. A.c Incidence

Les MH sont les MGT les plus fréquentes (Slim, 2017) et leur incidence est corrélée au niveau de développement d'un pays donné. La fréquence des MH la plus importante est retrouvée en Indonésie, où elles représentent 13 ‰ grossesses (Shang, 1982). De manière générale, les pays d'Asie du Sud-Est semblent être les plus touchés par cette pathologie (Hui, 2017). Au japon, ce taux était de 4,9 ‰ (Takeuchi, 1987) dans les années 1980. Avec le développement socio-économique du pays, ce taux est actuellement de 1,9 ‰ (Hando, 1998) ; cependant, il reste légèrement supérieur à celui de l'occident qui est de 1,6 ‰ (Golfier, 2010).

Très peu de littérature existe sur l'incidence des MH en Afrique. Quelques revues relatent une fréquence de ces pathologies d'environ 5 ‰ grossesses (Agboola, 1979 ; Ayangade, 1979 ; Diejomaoh, 1984 ; Boufettal, 2011).

1. A.d Les facteurs de risques

De nombreux facteurs de risques de survenue des MH ont été décrits dans la littérature.

L'âge

Le facteur de risque le plus important est l'âge. En effet, les âges extrêmes de conception augmentent le risque de survenue des MH. Celui-ci est augmenté de 1,5 % avant 16 ans et de plus de 7,6 % chez les femmes de plus de 45 ans (Dreyfus, 2000 ; Golfier, 2010). Chez les femmes de plus de 45 ans, l'augmentation du risque serait due à une altération de la qualité ovocytaire (Fleming, 2008).

Les antécédents gynécologiques

Le 2e facteur de risque serait représenté par les antécédents gynécologiques et obstétricaux de la patiente. Les antécédents de MH présentent un risque de récurrence de 1,5 % en moyenne après une première môle et de plus de 23 % après une seconde môle (Golfier, 2010). D'autre part, les antécédents d'interruption volontaire de grossesse (IVG) augmenteraient par 3 le risque de MH et par 23 après deux IVG consécutives (Horn, 2006).

Le groupe sanguin

Le groupe sanguin des patientes représente également un facteur de risque de la survenue des MGT. Il a été rapporté une fréquence plus élevée chez les patientes de groupe sanguin A et AB comparativement aux patientes de groupes B et O (Noal, 2010). Le mécanisme physiopathologique à l'origine de cette différence reste à élucider.

Le statut socio-économique

Le statut socio-économique des patientes, le climat et le régime alimentaire sont des facteurs de risques qui font actuellement débat (Hui, 2017). Ces facteurs pourraient expliquer la grande disparité de l'incidence des MH entre les pays développés et ceux qui le sont moins. Le manque, voire l'absence, de suivi médical réduit l'accès à la contraception et mène à des grossesses précoces ou, au contraire, très tardives. De plus, les carences nutritionnelles, notamment en vitamine A et B9, sont des risques supplémentaires de développement des MH (Berkowitz, 1985).

Une étude comparant l'incidence des MH entre la population souche et défavorisée de l'île d'Hawaï et la population japonaise, exilée sur cette île mais jouissant d'un niveau socio-économique élevé, a démontré que la population japonaise conservait un risque plus élevé. Ces données suggèrent que des facteurs autres que les facteurs socio-économiques influencent l'incidence de la survenue des MH (Matsuura, 1984).

Les facteurs génétiques

Depuis une dizaine d'années, les gènes *NLRP7* (Murdoch, 2006) et *KHDC3L* (Parry, 2011) ont été identifiés comme étant étroitement associés au développement des MH et en particulier les BiMH.

1. A.e Prise en charge et traitement des MH

La suspicion de MH à l'examen clinique est suivie de l'exérèse par aspiration du produit de fécondation. L'analyse histopathologique permettra de déterminer s'il s'agit bien d'une MH et de la classifier. Cet examen conditionnera le suivi de la patiente.

La principale mesure de suivi consistera en la surveillance de l'évolution du taux de la β-hCG jusqu'à sa négativation sous contraception afin de s'assurer de l'absence de MGT post-môlaire persistante. Il est recommandé de poursuivre le suivi jusqu'à l'observation d'au moins trois dosages de β-hCG hebdomadaires négatifs (Golfier, 2010). En revanche, toute nouvelle augmentation du taux de β-hCG sur au moins trois dosages hebdomadaires consécutifs ou stagnation de celui-ci sur 4 dosages hebdomadaires consécutifs doit évoquer la persistance d'une MGT.

Le risque de MGT post môlaire n'est pas négligeable surtout après une MHC. En effet, le risque de développer un CC après une MHC est estimé entre 8,9 % et 20 % contre 0,2 % et 4 % après un MHP (Noal, 2010).

1. B Le Choriocarcinome gestationnel

Le CC gestationnel appartient également à la famille des MGT. Il s'agit d'une néoplasie gestationnelle trophoblastique (NGT), tumeur maligne dérivée du trophoblaste.

1. B.a Définition

Le choriocarcinome gestationnel est une tumeur épithéliale caractérisée par une hyperprolifération des cytotrophoblastes et des syncytiotrophoblastes. Ces tumeurs sont hautement métastatiques avec pour niches principales le vagin et les poumons mais également parfois le cerveau, les reins, la rate et le foie. (Seckl, 2013 ; Froeling, 2014 ; Noal, 2010).

1. B.b Incidence

L'incidence des CC est estimée à 1 pour 40 000 grossesses dans les pays développés contre 1 pour 4500 en Asie du Sud-Est. Cette disparité géographique importante serait principalement due à la prise en charge précoce des MH dans les pays développés (Shrivastava, 2014).

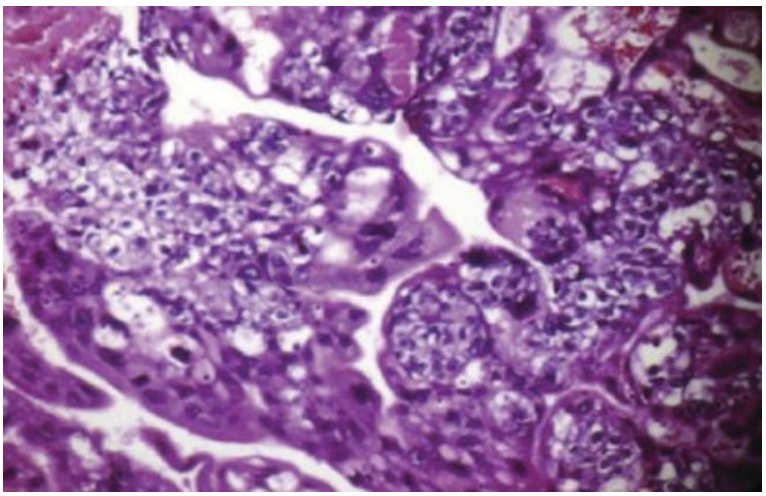


Figure 20 - Histologie du choriocarcinome

Figure adaptée du rapport du Pr Denis Vinatier pour l'HAS, 2012.

Coupe histologique d'un choriocarcinome gestationnel colorée à l'hématoxyline-éosine.

Stade FIGO	Description
I	Tumeur trophoblastique gestationnelle strictement limitée au corps utérin.
II	Tumeur trophoblastique gestationnelle étendue dans le vagin, mais limitée aux structures génitales.
III	Tumeur trophoblastique gestationnelle métastasée dans les poumons, avec ou sans présence dans les voies génitales.
IV	Multiples sites métastatiques ; Foie, reins, rate et cerveau.

Tableau 1 - Classification FIGO des néoplasies gestationnelles trophoblastiques

Facteurs pronostiques	Score			
	0	1	2	4
Age (ans)	< 40	≥ 40		
Grossesse Antécédente	Môle	Avortement	A terme	
Intervalle entre la grosesse précédente et la chimiothérapie	< 4	4 - 6	7 - 12	> 12
hCG (UI/L)	$< 10^3$	$10^3 - 10^4$	$10^4 - 10^5$	$> 10^5$
Nombre de métastases	0	1 - 4	5 - 8	> 8
Sites métastatiques	Poumon	Rein, Rate	Intestin	Cerveau, Foie
Masse tumorale la plus grosse (cm)		3 - 5	> 5	
Chimiothérapie précente			Monothérapie	Thérapie combinée

Le score total est calculé en additionnant les scores individuels pour chaque facteur de pronostique.
Faible risque : 0 - 6 ; haut risque : 7 ou plus

Tableau 2 - Système d'évaluation du score FIGO des néoplasies gestationnelles trophoblastiques

L'incidence des CC après une MHC est estimée à 1 pour 40 mais ils peuvent également survenir après une MHP, une grossesse normale à terme, une IVG ou une fausse couche spontanée. Environ, 50 % des CC sont dérivés d'une MH, 25 % font suite à une grossesse normale et les derniers 25 % font suite à une IVG ou une grossesse extra-utérine (Seckl, 2010).

1. B.c Caractéristiques histologiques

Les tumeurs choriocarcinomateuses sont essentiellement formées de cellules de type cytotrophoblastiques et syncytiotrophoblastiques à morphologies variables (figure 20). Ces cellules forment une masse dépourvue de villosités choriales généralement nécrotiques et hémorragiques qui envahissent directement le myomètre et les vaisseaux maternels (Arima, 1994).

1. B.d Facteurs de risque

Les facteurs de risques du CC sont : ***i)*** des antécédents de MHC, ***ii)*** un âge maternel avancé, ***iii)*** le groupe sanguin de type A, ***iv)*** l'appartenance à certaines ethnies en relation avec le statut socio-économique, et ***v)*** et la prise à long terme de contraception orale.

1. B.e La prise en charge

Le traitement des NGT se fait généralement par chimiothérapie (Golfier, 2010). La détermination du protocole adapté à chaque patiente dépend du stade et du score établis par la Fédération Internationale de Gynécologie-Obstétrique (FIGO). Ce système permet d'évaluer et de classifier le degré de sévérité de la pathologie (tableaux 1 et 2).

Pour les patientes présentant un faible risque (stade I-II / score FIGO < 6), la monothérapie à l'Actinomycine D ou le Méthotrexate est préconisée. En l'absence de réponse à ces traitements, la chimiothérapie multi-agents peut être envisagée. Pour cette catégorie de patientes le taux de rémission est bon et proche de 100 % (Lurain, 2011).

Pour les patientes à haut risque (stade III-IV / score FIGO >7), la chimiothérapie multi-agents montre de bons résultats. Le taux de rémission complète est de 85 % et le taux de survie à 5 ans d'environ 75 % (Deng, 2013). Cependant, les patientes atteintes de métastases au foie et/ou au cerveau montrent de moins bons résultats (Ahamed, 2012 ; Neubauer, 2012 ; Newlands, 2002).

La chirurgie a aussi un rôle à part entière dans la prise en charge des NGT. En effet, l'exérèse de la tumeur primaire et des métastases évite les risques hémorragiques et améliore la survie des patientes présentant des tumeurs résistantes aux traitements.

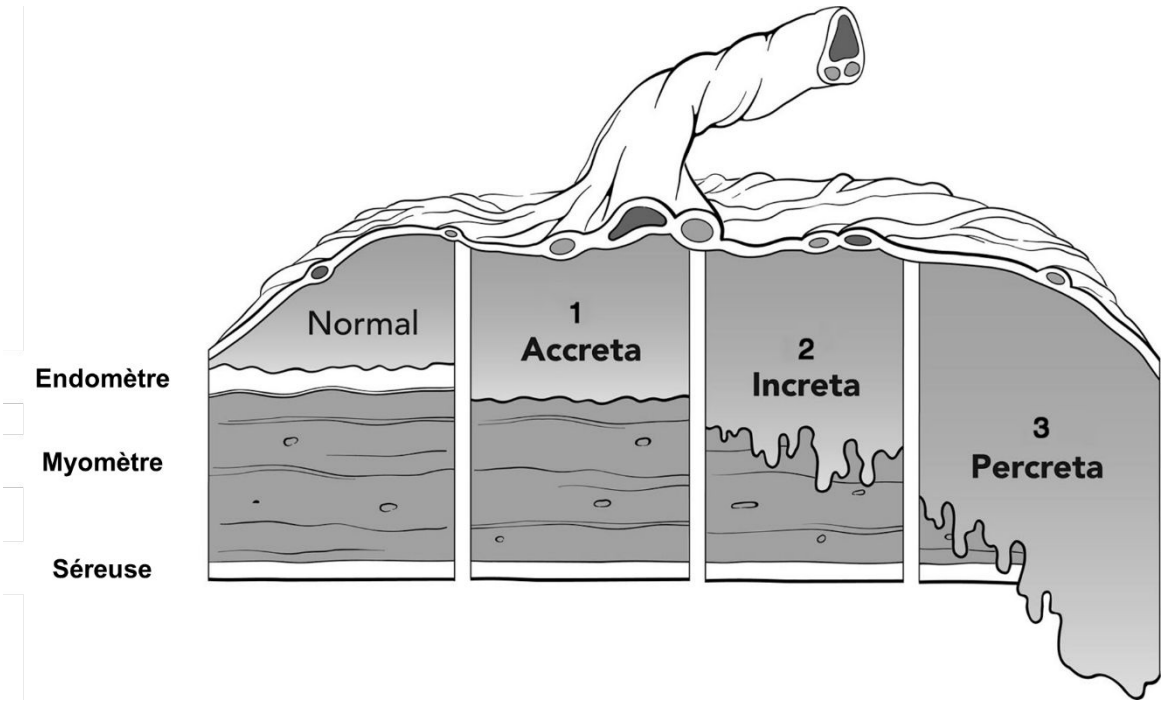


Figure 21 - Schéma illustrant le degré d'invasion placentaire

Image adaptée de ***anesthesiology.org***

Des travaux très récents de notre groupe ont démontré l'implication du facteur de croissance EG-VEGF dans le développement et la progression tumoral du CC *in vivo,* dans notre modèle orthotopique. De façon intéressante, ces travaux ont mis en évidence le potentiel thérapeutique de l'antagoniste du récepteur de type 2 de l'EG-VEGF, PROKR2, dans le traitement du choriocarcinome (Traboulsi, 2017). Dans le contexte de la preuve de concept qu'un traitement inhibiteur de la signalisation EG-VEGF pourrait être envisagé comme alternative aux chimiothérapies, notre groupe est en cours de développement d'anticorps anti-PROKR2 monoclonaux à destinée immuno-thérapeutique. Ce nouveau traitement pourrait offrir une option thérapeutique intéressante aux femmes porteuses de tumeurs résistantes aux chimiothérapies.

2. Pathologies non tumorales de la grossesse

Parmi les pathologies non tumorales de la grossesse, on peut également retrouver une pathologie associée à un excès d'invasion trophoblastique appelée placenta accreta.

2. A Placenta Accreta

On retrouve dans la littérature la terminologie de « placenta accreta spectrum » pour dénommer une catégorie rare de pathologie de la grossesse, associée à des anomalies d'insertion placentaire. Le spectre de cette pathologie regroupe trois formes de ce type de placentation : placenta accreta, increta et percreta. Le terme accreta est souvent utilisé lorsque l'on décrit les caractéristiques communes à ces trois formes. Je me permets de faire de même pour la suite de cette section.

2. A.a Définition

Les trois types anatomiques composant cette pathologie se différencient par leur degré d'invasion :

Comme illustré sur la figure 21-1, le placenta accreta est caractérisé par une invasion trophoblastique superficielle du myomètre. Il s'agit de la forme la plus fréquente d'invasion placentaire excessive. Elle représente 75 % des cas (Bartels, 2018).

Le placenta est dit increta (figure 21-2) lorsque les villosités pénètrent le myomètre.

Enfin, dans de très rare cas, il est dit percreta (figure 21-3). Dans ce cas les villosités choriales traversent le myomètre et atteignent la séreuse et les organes pelviens au voisinage.

Malgré l'absence de malignité associée à cette pathologie, les placentas accreta partagent de nombreuses caractéristiques communes au développement tumoral. Il ressort de la littérature que les trophoblastes issus de placentas accreta expriment des marqueurs spécifiques en lien avec chacune des « Hallmarks » du cancer, décrit par Hanahan et Weinberg en 2011. De manière non exhaustive, ces « hallmarks » sont représentés par une prolifération soutenue, une invasion active, une induction de l'angiogénèse, un échappement au système immunitaire, etc. (Hanahan, 2011). A titre d'exemple, des dérégulations de l'expression de protéines telles que l'*epidermal growth factor receptor* et l'oncogène c-erbB-2 dans le ST ont été rapportées dans les trophoblastes issus de placenta accreta (Tseng, 2004). Ces protéines participeraient à la création d'un microenvironnement propice à une prolifération cellulaire soutenue tant dans le placenta que dans la tumeur. En lien avec une invasion excessive et dérégulée dans cette forme de placentation, le maintien de caractéristiques propres à la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) a été rapportée pour les CTEV du 3e trimestre issus de placenta accreta (Zhu, 2012). L'EMT est un processus qui permet aux cellules épithéliales d'acquérir un phénotype migratoire. Elle est indispensable aux phénomènes de migration et invasion cellulaire au cours du développement placentaire et tumoral (Duzyj, 2015 ; Hanahan, 2011).

2. A.b Facteurs de risques

Outre l'âge maternel avancé et le tabagisme, tous les facteurs connus pour avoir une influence sur le développement placentaire peuvent de ce fait contribuer à la pathogénèse des accreta. Les profils à haut risque les plus rapportés dans la littérature sont ceux de patientes ayant un utérus cicatriciel et/ou un placenta previa (ACOG, 2018), pathologie consistant en l'implantation du placenta au niveau du col de l'utérus. L'American College of Obstetricians and Gynelogists a estimé que l'incidence des accreta a été multipliée par 10 en 50 ans (ACOG, 2002). L'augmentation de leur fréquence est corrélée à l'augmentation du recours à la césarienne (Rao, 2012 ; Silver, 2015). En dehors de toute anomalie placentaire, la fréquence des accreta est extrêmement rare, cependant elle concerne 2 à 3 % des patientes ayant subi une césarienne. Ce taux augmente de manière exponentielle à chaque nouvelle intervention (Yeaton-Massey, 2014). Il est important de noter que les cicatrices utérines peuvent également être consécutives à l'ablation de fibrome ou de lésions endométriosiques ou bien à un curetage utérin suite à une IVG ou à un avortement spontané. Ces patientes sont à intégrer à la population à risque de développement de ces pathologies. Par ailleurs, le risque de placenta accreta augmente de 50 % en cas de placenta previa (Bartels, 2018).

Bien que de nombreuses études démontrent une dérégulation des propriétés trophoblastiques au cours de ces pathologies, certains auteurs suggèrent que le développement de la majorité des accreta est dû à des défauts au niveau de la muqueuse utérine. Ces défauts peuvent être physiologiques, associés à une épaisseur réduite de l'endomètre dans les régions avoisinants le col de l'utérus, pathologique, dans le cas de malformations utérines, ou traumatiques comme des défauts de ré-épithélialisation au niveau des incisions de césarienne (Jauniaux, 2017)

2. A.c Prise en charge et traitement

Cette pathologie asymptomatique pour la mère et le fœtus est généralement diagnostiquée en fin de grossesse car elle peut induire des saignements modérés au cours du 3e trimestre. Les patientes ne nécessitent pas de prise en charge particulière au cours de la grossesse. En revanche, l'accouchement se déroule sous haute surveillance. A ce jour, seuls 50 % des cas de placenta accreta seraient diagnostiqués (Fitzgerald, 2013). Il s'agit principalement des patientes présentant les facteurs de risques caractéristiques. Bien que la gravité des complications engendrées par ces pathologies dépende du degré d'invasion trophoblastique (jauniaux, 2017), les hémorragies de la délivrance causées par cette pathologie représentent une des causes majeures de décès maternel périnatal (Knight, 2017). Par ailleurs, outre le risque de décès, une hystérectomie souvent totale est nécessaire selon l'abondance des saignements en post opératoire (Fitzgerald, 2013).

Parmi les pathologies non tumorales de la grossesse, les plus fréquentes sont la pré-éclampsie et le retard de croissance intra-utérin. Ces deux pathologies peuvent survenir seules ou en association. La thérapie préconisée, à ce jour, est la délivrance placentaire (Abalos, 2014 ; Kramer, 2003).

2. B La pré-éclampsie

La pré-éclampsie (PE) est un syndrome de la grossesse qui représente la cause principale de morbidité et mortalité materno-fœtale. Elle concerne 2 à 5 % des grossesses dans les pays occidentaux (Abalos, 2014). La PE est une pathologie complexe, spécifique de l'espèce humaine et dont les causes ne sont pas totalement connues. Néanmoins, de nombreuses études suggèrent que des défauts de développement placentaire précoces, tel que le remodelage insuffisant des artères spiralées utérines (Pijnenborg, 1983 ; Kaufmann, 2003), soient impliqués dans le développement de la PE.

De façon intéressante, une origine génétique du développement de la PE a été récemment rapportée. Il s'agit d'une mutation « gain de fonction » du gène du facteur de transcription STOX1 (Storkhead Box 1) (Doridot, 2013).

Par ailleurs, la PE peut représenter une complication des MH (Ditisheim, 2015).

Entité	Définition
Prééclampsie non protéinurique	Hypertension gestationnelle et ≥1 des critères suivants : - Symptômes de PE - Hémolyse - Thrombocytopénie (< 10^5 /mm^3) - Elévation des test hépatiques (> à 2 fois la limite maximale)
Prééclampsie normotensive	Protéinurie gestationnnelle et ≥1 des critères suivants : - Symptômes de PE - Hémolyse - Thrombocytopénie (< 105 /mm3) - Elévation des test hépatiques (> à 2 fois la limite maximale)
Prééclampsie - éclampsie < 20 SA	Prééclampsie ou éclampsie survenant avant la 20ème SA
Prééclampsie - éclampsie du post-partum	Prééclampsie ou éclampsie survenant entre 48 h et jusqu'à 6 semaines après l'accouchement

Tableau 3 - Définition des pré-éclampsies atypiques

Tableau adapté de Ditisheim, 2015.

2. B.a Définition

La PE est un syndrome obstétrical (association de plusieurs signes et symptômes) survenant classiquement à partir du 2e trimestre de la grossesse. L'American Journal of Obstetricians and Gynecologists l'a défini comme l'apparition d'une hypertension artérielle après 20 SA associée à une protéinurie nouvelle et/ou une atteinte organique unique ou multiple (ACOG, 2013). Certains auteurs intègrent également l'insuffisance utéro-placentaire avec RCIU aux critères diagnostiques. Ce dernier critère purement fœtal pourrait même suffire, selon ces auteurs, à poser le diagnostic en l'absence de manifestations maternelles (Tranquilli, 2014). Par ailleurs, il existe également des cas atypiques de PE dont les symptômes développés par les patientes ne répondent pas totalement aux critères diagnostiques.

2. B.b Présentations cliniques des PE atypiques

Les PE atypiques sont définies par 4 entités cliniques distinctes (tableau 3) : les PE non protéinuriques, les PE normotensives, les PE et éclampsies précoces et les PE et éclampsies du post-partum.

Les PE non protéinuriques sont les plus fréquentes (Rojas-Arias, 2015). De façon intéressante, la majorité des cas de PE et éclampsie précoces < 20 SA est associée aux grossesses môlaires (Sibai, 2009 ; Ochiai, 2012) sans que l'on ne connaisse le mécanisme physiopathologique associé à la survenue de cette complication.

2. B.c Prise en charge et traitement

Qu'elles soient classiques ou atypiques, les PE sont prises en charge de la même manière. A ce jour, aucun traitement curatif n'est connu pour la PE ; seule la délivrance placentaire permet le rétablissement maternel (Redman, 1991). Cette situation est d'autant plus compliquée qu'elle intervient précocement au cours de la grossesse ou quand la PE est compliquée par un RCIU.

Tout l'enjeu de la prise en charge de cette pathologie réside dans l'évaluation du rapport bénéfice maternel versus risque fœtal d'une naissance prématurée.

2. C Le retard de croissance intra-utérin

2. C.a Definition

A ce jour, il n'existe pas de consensus concernant la définition du RCIU au sein des multiples sociétés savantes et collèges d'experts (Dall'Asta, 2017). En revanche, un critère diagnostique semble faire l'unanimité. Il s'agit de l'estimation du poids fœtal inférieur au 10e percentile pour un âge gestationnel donné. Cela signifie que le poids du fœtus en question appartient aux 10 % des fœtus les plus petits pour un genre et un âge gestationnel donné. Le 3e percentile caractérise les RCIU dits sévères. Il est à noter que les références de poids varient selon les pays en raison des différences dans les caractéristiques des populations et de la méthodologie des courbes utilisées. Par ailleurs, le RCIU est souvent associé à une altération du bien-être fœtal (oligoamnios, réduction de la quantité de liquide amniotique ou anomalies au doppler) (Pr MV Sénat, HAS, France).

Le RCIU est à distinguer du petit poids de naissance qui est défini selon l'organisation mondiale de la santé (OMS) comme inférieur à 2500 g quel que soit le terme. Il est donc préférable de caractériser le RCIU par un arrêt ou un infléchissement de la courbe de croissance du fœtus. De plus, cela permet de distinguer les fœtus à RCIU et les fœtus constitutionnellement plus petits du fait de leur origine ethnique, de leur sexe ou de leur patrimoine génétique (Pr MV Sénat, HAS, France).

Les courbes individuelles adaptées (Gardosi, 1995) sont utiles au diagnostic du RCIU. En effet, elles permettent de prédire le potentiel de développement d'un fœtus en tenant compte des caractéristiques maternelles telles que la taille, le poids, l'origine ethnique et la parité dont l'influence sur le poids fœtal a été démontrée (Gardosi, 1995 b).

2. C.b Epidémiologie

Le RCIU affecte 6 à 9 % des grossesses en Europe et jusqu'à 54 % des grossesses dans les pays en voie de développement. Ces taux sont corrélés au développement économique des différents pays et à la qualité du suivi des grossesses (Kramer, 2003). L'insuffisance de croissance du fœtus lors d'un RCIU est une des causes majeures de mortalité et morbidité périnatales (Rosenberg, 2008). Elle est souvent associée à une grande prématurité survenant avant 32 SA, dont près de 50 % sont induites du fait de l'absence de traitement et du risque très élevé de mort *in utero*.

Le RCIU est à l'origine de handicaps congénitaux très importants incluant des déficiences motrices et intellectuelles ainsi que des pathologies cardiovasculaires, pulmonaires et/ou métaboliques (Yzydorczyk, 2017 ; Aljunaidy, 2017 ; Fouron, 2017). Plusieurs études ont démontré un lien étroit entre le petit poids à la naissance et la survenue de pathologies métaboliques se révélant à l'âge adulte telles que des maladies cardiovasculaires, des dyslipidémies, l'insulino-résistance ou le diabète (Fouron, 1993 ; Morton, 2016 ; Barker, 1995 ; Barker, 1995 b ; Tideman, 2007).

Le RCIU est classé en deux catégories en fonction du terme à partir duquel la pathologie se manifeste. On distingue les RCIU dits précoces en opposition à ceux plus tardifs. Les RCIU précoces, survenant avant la 32e SA, ne représentent que 20 à 30 % des cas et sont associés dans plus de 70 % des cas à une HTAg et dans plus de 50 % à une PE (Lees, 2013). Les RCIU précoces ont le pronostic le plus défavorable surtout pour les RCIU sévères et/ou antérieur à 26 SA. Ils présentent plus de risques d'anomalies du développement cérébral, à court et long termes, mais également de complications métaboliques et cardiovasculaires (Flood, 2014).

2. C.c Etiologie

Les causes du RCIU sont hétérogènes et peuvent être regroupées en deux grandes classes : les causes non placentaires et les causes placentaires.

A la frontière de ces deux groupes, on retrouve la multiplicité de la grossesse comme facteur de risque du RCIU. En effet 20 à 30 % des fœtus issus de grossesses gémellaires dichoriales souffrent de RCIU et ce taux s'élève à plus 40 % dans les cas de grossesses multiples monochoriales (Jackson, 2004).

On retrouve aussi les défauts de développement vasculaire du cordon ombilical, reliant physiquement la face fœtale du placenta à la circulation sanguine fœtale, tels que le cordon ombilical maigre (diamètre < 1 cm) et plus fréquemment le cas de l'artère ombilicale unique. Bien que, dans la majorité des cas, la présence d'une seule artère ombilicale n'affecte pas le développement fœtal, près de 30 % des nourrissons naissent avec un RCIU important, inférieur au 5e percentile (Friebe-Hoffmann, 2018).

Les causes non placentaires

Celles-ci incluent les anomalies chromosomiques ou génétiques du fœtus (trisomie 13 ou 18 ou encore le syndrome de Silver-Russel), les infections virales durant la grossesse (la rubéole, le cytomégalovirus ou la toxoplasmose) (McCowan, 2009) ainsi que les pathologies métaboliques du fœtus. Parmi les causes non placentaires du RCIU, on compte aussi les risques purement maternels tels qu'un petit gabarit, un indice de masse corporelle réduit durant la grossesse, une faible prise de poids due à une sous-alimentation mais également un âge maternel précoce ou trop avancé au moment de la conception (Alfirevic, 2002).

Par ailleurs, la prise de toxique comme l'alcool, le tabac ou la drogue est aussi considérée comme cause majeure de la survenue du RCIU (Jaddoe, 2007 ; McCowan, 2009 b ; Gouin, 2011).

Les causes placentaires

Le placenta étant au cœur des échanges de nutriments et d'oxygène entre la mère et le fœtus, il est naturel de supposer que l'insuffisance placentaire est responsable de la majorité des cas de RCIU (Dall'Asta, 2017). Parmi les causes placentaires du RCIU, les pathologies au cours de la grossesse (maladies cardio-vasculaires, pathologies métaboliques, PE) et les défauts de développement placentaire pouvant causer un phénomène d'hypoperfusion utéro-placentaire sont mises en évidence (Sibai, 1983 ; Langer, 1989). Cependant, les causes d'un développement anormal du placenta peuvent être multiples et sont, à ce jour, loin d'être caractérisées.

Le RCIU peut aussi être d'origine vasculaire. Il s'agit le plus souvent de malperfusions vasculaires maternelles associées ou non à des phénomènes de malperfusions vasculaires fœtales. Ces phénomènes de malperfusions vasculaires d'origine maternelle regroupent les défauts de remodelage des artères spiralées utérines (Arroyo, 2008 ; Charolidi, 2018 ; *cf.* Chapitre I.3 remodelage des artères spiralées utérines), des infarctus placentaire associés à une ischémie et des hypoplasies distales des villosités placentaires. Il a été démontré que ces problèmes de perfusions placentaires induisent une maturation accélérée des villosités en compensation (Sehgal, 2018). Du coté fœtal, on retrouve des anomalies telles que des villosités avasculaires ou comportant des vaisseaux aveugles et même des thromboses vasculaires (Sehgal, 2018).

Des études récentes ont rapporté une fréquence plus importante d'anomalies d'origine maternelle dans les RCIU précoces tandis que les RCIU tardifs sont plus généralement associés à des fréquences d'anomalies d'origine fœtale. En revanche, son initiation après 32 SA semble liée à la synergie de défauts vasculaires d'origine maternelle et fœtale (Kovo, 2013).

Bien que les défauts de perfusion placentaire augmentent de plus d'un facteur 4 le risque de RCIU et soient responsables de près de 25 % des cas de RCIU et PE (Wright, 2017), une apoptose des trophoblastes et une inflammation placentaire (Kovo, 2013 ; Cotechini, 2014) accrues ont également été rapportés. De nombreuses études établissent une association étroite entre l'inflammation et le développement de la PE et du RCIU. Elles démontrent une infiltration accrue du nombre de cellules immunitaires dans le stroma des villosités placentaires limitant ainsi l'invasion trophoblastique (Khong, 1986 ; Bartha, 1999). Des taux de cytokines et chémokines pro-inflammatoires très élevés ont également été observés (Bartha, 2003 ; Szarka, 2010).

L'inflammation semble être un acteur majeur du développement du RCIU. Chez l'animal, l'inflammation est associée à des défauts de développement placentaire tels qu'une diminution de la perfusion utéro-placentaire et une hypoxie placentaire (Renaud, 2011). Plusieurs études ont démontré que le traitement de rattes gravides avec un inducteur de l'inflammation intracellulaire stérile suffit à la survenue d'un RCIU dans la portée associée à une malperfusion utéro-placentaire, un défaut de remodelage des artères spiralées et à des anomalies morphométriques des placentas (Cotechini, 2014 ; Brien, 2017).

Ces données établissent un lien fort entre l'inflammation et le développement du RCIU. Elles ouvrent un champ de recherche très vaste et potentiellement de nouvelles options thérapeutiques pour cette pathologie.

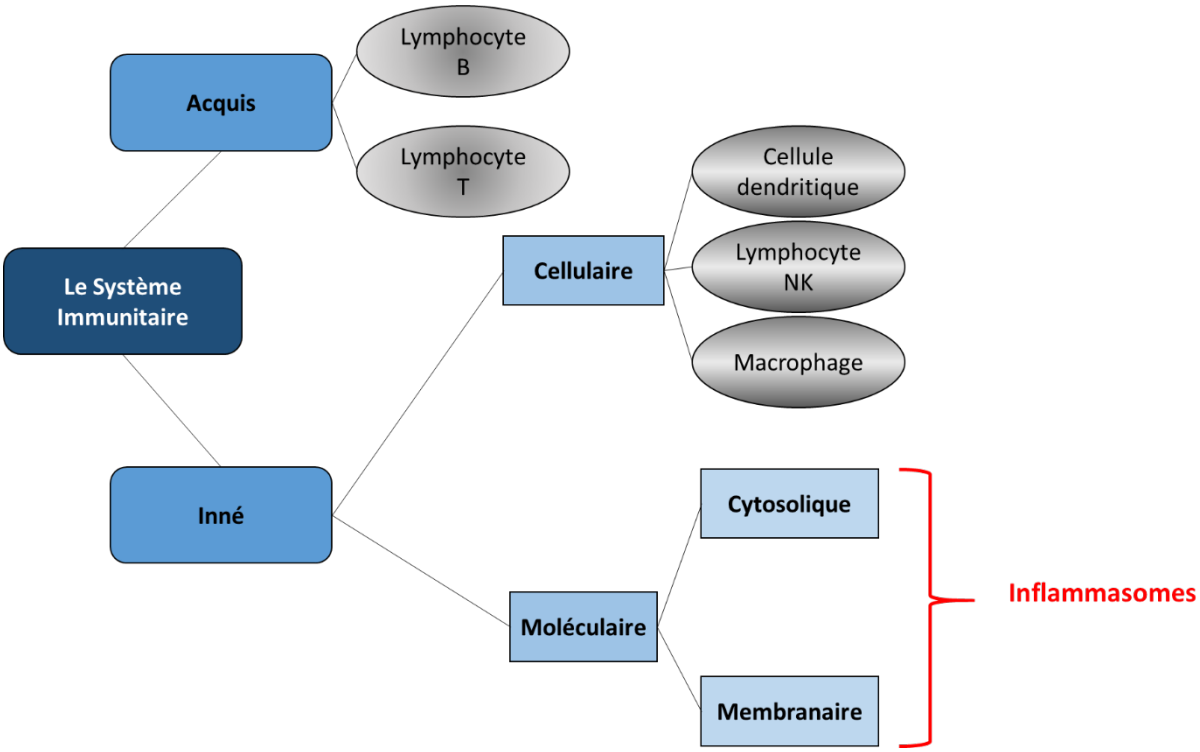


Figure 22 - Schéma de l'organisation des acteurs du système immunitaire

Le SI est constitué de deux sous-systèmes, le SI acquis et le SI inné dont la composante moléculaire est à l'origine des inflammasomes.

CHAPITRE III

Les inflammasomes

Le système immunitaire (SI) constitue l'ensemble des mécanismes de défense de l'organisme contre les agressions dont il fait l'objet. Il se décompose en deux sous-systèmes : l'immunité acquise et l'immunité innée.

Le système immunitaire acquis fait intervenir les lymphocytes B et T qui, une fois activés, forment un pool mémoire des infections. Cette mémoire des infections déjà contractées assure une réponse plus rapide au second contact et est donc spécifique à chaque pathogène.

Le système immunitaire inné est la première ligne de défense de l'organisme. Il s'agit d'une réponse immunitaire stéréotypée identique pour tous les signaux reconnus comme un danger pour l'organisme. Ce sous-système est constitué d'une composante cellulaire, les cellules dendritiques, les lymphocytes « Natural Killer » et les macrophages ainsi que d'une composante moléculaire représentée par les inflammasomes (figure 21). (Howell, 2018)

Le terme *inflammasome* a été proposé pour la première fois par le groupe du Dr Tschopp en 2002 pour désigner un complexe moléculaire intégrant une caspase 1 capable de produire les cytokines pro-inflammatoires, les interleukines (IL)-1β et (IL)-18 (Martinon, 2002).

Les inflammasomes sont des complexes oligomériques multiprotéiques capables d'initier et d'entretenir une réponse inflammatoire. La caractéristique principale des inflammasomes réside dans le fait qu'ils soient exclusivement constitués de protéines synthétisées par les cellules. Ils déclenchent une réponse immunitaire extrêmement rapide et adéquate contre des pathogènes ou des fragments de cellules endommagés de l'hôte et ne nécessitent pas de contact initial pour induire la réaction. De plus, ils ne font pas intervenir de cellules immunitaires ; les inflammasomes ne sont donc pas adaptatifs (Howell, 2018). Il s'agit d'un processus intracellulaire qui peut s'initier dans toutes les cellules exprimant les médiateurs de l'activation des caspases pro-inflammatoires.

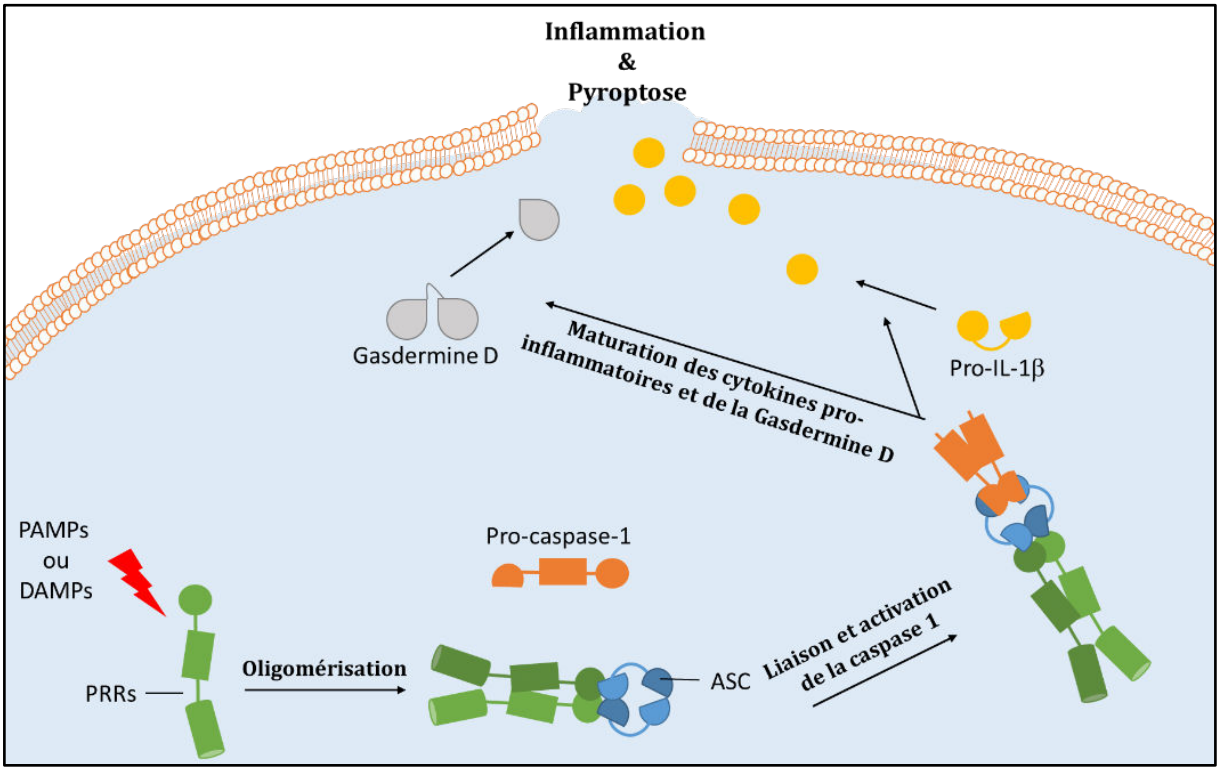


Figure 23 - Schéma de l'activation des inflammasomes

Figure inspirée de Broz, 2016.

La reconnaissance d'un PAMPs ou DAMPs par le PRR induit son association à l'ASC et son oligomérisation. Le complexe recrute la caspase 1 conduisant à son activation et à la maturation des cytokines pro-inflammatoires et de la Gasdermine D.

1. Fonctionnement des inflammasomes

Les médiateurs de l'activation des caspases pro-inflammatoires sont appelés les PRRs (Pattern Recognition Receptors). Ce sont des senseurs intracellulaires de PAMPs (Pathogen-associated Molecular Patterns) ou DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns) qui sont, respectivement, des motifs structurels conservés d'origine pathogène ou issus de cellules lésées de l'hôte. Ces molécules sont perçues comme des signaux de danger pour l'organisme. Elles déclenchent l'initialisation d'un programme de défense intracellulaire spécifique dont le but ultime est d'éliminer tout signal dangereux pour l'hôte (Radian, 2013).

L'activation d'un PRR conduit à son association à une protéine adaptatrice et à son oligomérisation permettant une interaction avec la caspase 1. Une fois activée, la caspase 1 induit le clivage des pro-IL-1β et pro-IL-18 en IL-1β et IL-18 matures qui pourront être sécrétées et induire une inflammation. La caspase 1 peut également induire l'inflammation via le clivage protéolytique d'une protéine dénommée, gasdermine D (Broz, 2016). Celle-ci initiera la pyroptose, phénomène de mort cellulaire inflammatoire programmée qui diffère de l'apoptose (figure 23).

Le phénomène de pyroptose se distingue de l'apoptose par trois aspects. Premièrement, comme l'apoptose, il s'agit d'un phénomène programmé et initié par une caspase. Cependant, contrairement aux caspases spécifiques de l'apoptose, les caspases de la pyroptose ne peuvent s'auto-induire de façon directe. L'activation de ces caspases sera toujours initiée par la formation de l'inflammasome. Deuxièmement, au cours de la pyroptose, l'activation des caspases induit la formation de pores membranaires constitués de gasdermine D. La perméabilisation cellulaire qui en résulte provoque une entrée massive d'ions et d'eau dans la cellule causant un gonflement cellulaire suivi d'une lyse. La formation de pores membranaires est spécifique de la pyroptose. Enfin, comme lors de l'apoptose, on observe une fragmentation de l'ADN mais de plus faible échelonnement. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'il ne soit pas lié à l'activation des DNases dépendantes des caspases. Aussi, à la différence de l'apoptose, la fragmentation du matériel génétique de la cellule n'est pas indispensable à la pyroptose (Jorgensen, 2015 ; Feng, 2018).

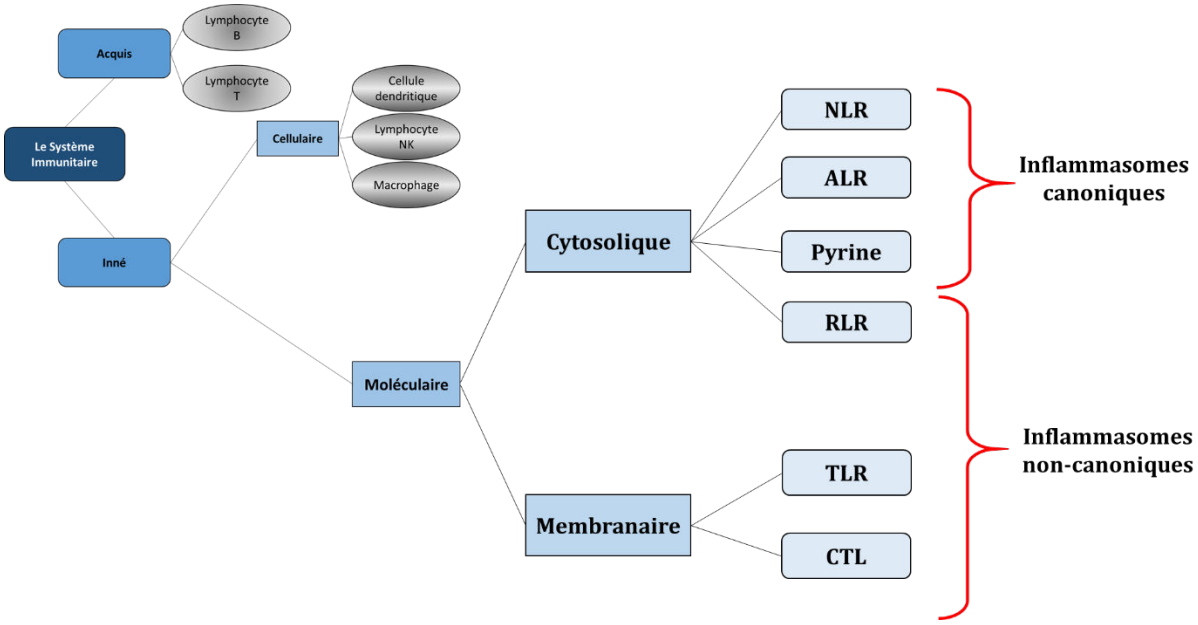


Figure 24 - Principaux acteurs du système immunitaire moléculaire

Les composants moléculaires du SI sont soit membranaires soit cytosoliques. Les TLRs, CTLs et RLRs forment des inflammasomes non canoniques tandis que les Pyrines, les ALRs et NLRs forment des inflammasomes canoniques.

2. Structure des Inflammasomes

De par leur mode de fonctionnement, les inflammasomes sont classés en deux groupes : les inflammasomes classiques dits canoniques, associés à l'activation de la caspase1, et les inflammasomes non canoniques qui déclenchent l'inflammation via l'activation d'autres caspases. Les inflammasomes classiques sont composés de trois éléments : un PRR, une protéine adaptatrice, appelée ASC, et une enzyme capable de catalyser la maturation des cytokines, la caspase 1 (figure 23).

2. A La superfamille des PRRs

Les PRRs ou senseurs moléculaires peuvent-être divisés en deux groupes : les PRRs localisés à la membrane de la cellule - les TLRs (Tool-like Receptors) et les CTLs (C-type Lectine Receptors) - et les PRRs intracellulaires - les RLRs (Retinoic acid Inducible Gene 1 (RIG1)-Like Receptors), les ALRs (Absent In Melanoma (AIM)-Like Receptors), la Pyrine, et les NLRs (Nucleotide Oligomerization Domain (NOD)-Like Receptors) (figure 24).

2. A.a Les TLRs, CTLs, et RLRs

Les TLRs, les CTLs et les RLRs déclenchent l'inflammation par des voies non conventionnelles impliquant essentiellement l'activation de la caspase 8 (Gringhuis, 2012). A ce jour, seul le TLR4 est associé à un mécanisme différent. En réponse au LPS (Lipopolysaccharide), il active les caspases 4 et 5 qui sont responsables du déclenchement de la pyroptose et de l'activation de l'inflammasome canonique NLRP3 qui active la caspase 1 (Baker, 2015).

2. A.b La Pyrine et les ALRs

La pyrine est le produit du gène *MEFV*. Elle est constituée d'un domaine PYD en N-terminal et peut être activée par de multiples PAMPs pour initier une inflammation intracellulaire (Broz, 2016 ; Chae, 2011). Certains auteurs la créditent d'un rôle de régulateur négatif de l'inflammation locale car elle aurait la capacité de diriger certaines protéines comme NLRP1, NLRP3 et caspase 1 vers le système de dégradation autophagique (Kimura, 2010).

Les ALRs présentent également un domaine PYD en N-terminal qui initie l'activation de l'inflammasome et un domaine HIN en C-terminal qui permet sa liaison à des molécules d'ADN double brins cytoplasmiques d'origine pathogène ou de l'hôte. Parmi les 4 ALRs connus à ce jour, seuls deux - AIM2 et IFI16 - sont reconnus pour former un inflammasome car ils permettent tous deux la sécrétion d'IL-1β dépendante de la caspase 1.

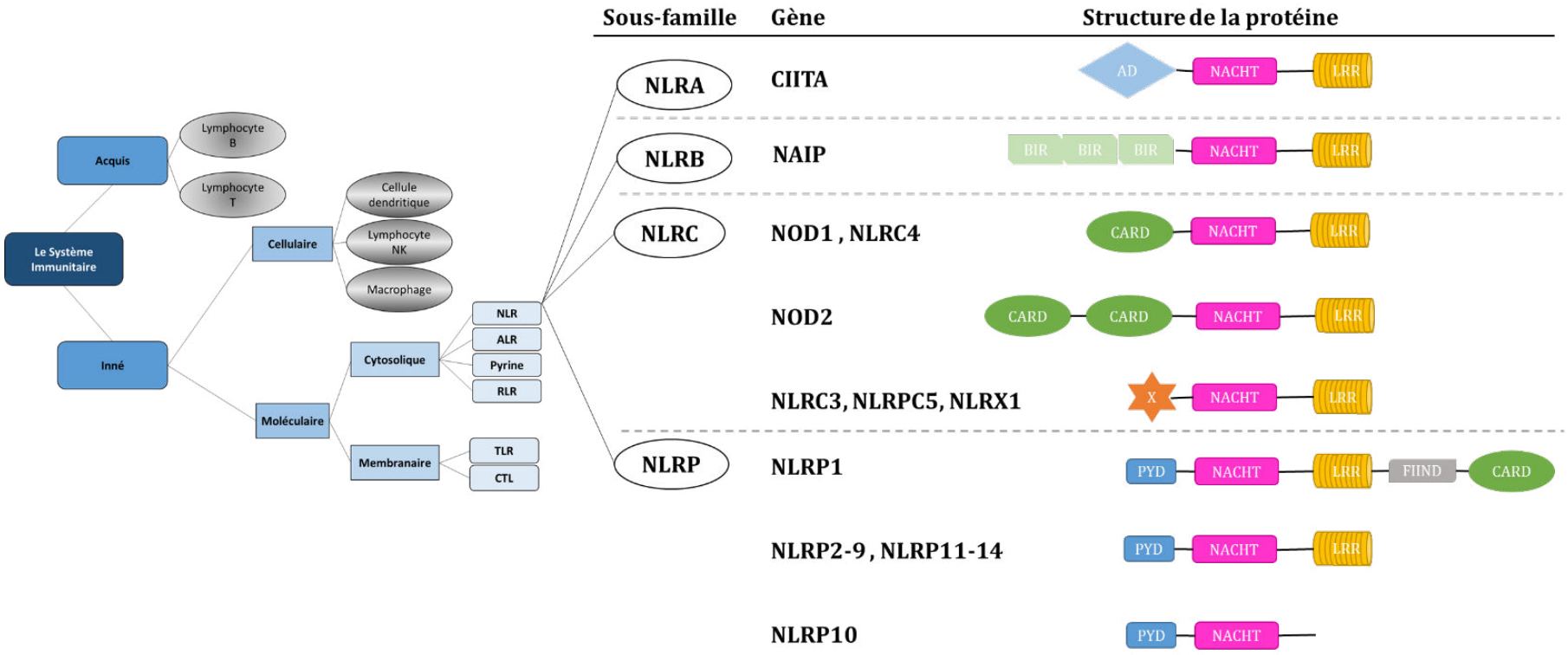


Figure 25 - Schéma illustrant la classification et la structure des protéines de la sous-famille des NLRs

Figure inspirée de Kim, 2016.

Description de la nomenclature et de la structure des NLRs. AD: acidic transactivation domain ; NACHT, for NAIP, CIITA, HET-T, and TP-1 ; BIR: baculovirus inhibitor of apoptosis repeat ; CARD: caspase activation and recruitment domain ; X, unidentified; PYD: pyrin domain, FIIND, function to find domain ; LRR: leucine-rich repeat ; NOD: nucleotide-binding and oligomerization domain.

2. A.c Les NLRs

A ce jour, on compte 22 protéines appartenant à la famille des Nod-Like Receptors. Elles sont capables d'être activées par une grande variété de ligands tant exogènes - PAMPs issus de bactéries, de champignons, de virus ou de protozoaires - qu'endogènes - DAMPs issus de l'hôte (acide urique, cristaux de cholestérols, fibres β-amyloïdes) ou de son environnement (silice, amiante, aluminium) (Kim, 2016). A ce jour, 8 NLRs sont reconnus comme ayant la capacité de former un inflammasome canonique : NAIP, NLRC4, NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRP6, NLRP7 et NLRP12. La structure commune de ces protéines est composée d'une région C-terminale appelée LRR (Leucine Rich Repeats) riche en répétition de Leucine et d'un domaine central appelé NACHT (Nucleotide Binding Domain). Le domaine LRR est essentiel à l'interaction avec le ligand spécifique et à l'activation du PRR. Le domaine NACHT est doté d'une activité dNTPase, c'est-à-dire d'une activité hydrolytique des désoxyriboNucléotides TriPhosphates. NLRP7 est notamment capable d'hydrolyser l'Adénosine TriPhosphate (Radian, 2015). Le domaine NACHT permet l'auto-oligomérisation de la protéine, processus nécessaire à la formation du complexe de l'inflammasome.

Les NLRs sont divisés en 4 sous-familles : NLRPAs, NLRBs, les NLRCs et les NLRPs, en fonction de leur domaine N-terminal (figure 25) (Kim, 2016).

Les NLRAs possèdent un domaine acide d'activation (AD). Ce sont des activateurs de la transcription des gènes du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II, les CIITA.

Les NLRBs sont caractérisés par la présence d'un domaine dénommé, Bacculoviral Inhibitory Repeats (BIR). Ils sont codés par le gène Neuronal-Apoptosis Inhibbitory Protein (NAIP).

Les NLRCs présentent quant à eux un Domaine de Recrutement et d'Activation de la Caspase (CARD).

Enfin les NLRPs ont un domaine N-terminal commun constitué d'un domaine pyrine (PYD). Seules les NLRPs seront décrits dans ce manuscrit, en particulier la protéine NLRP7 qui fait l'objet de mon projet de thèse.

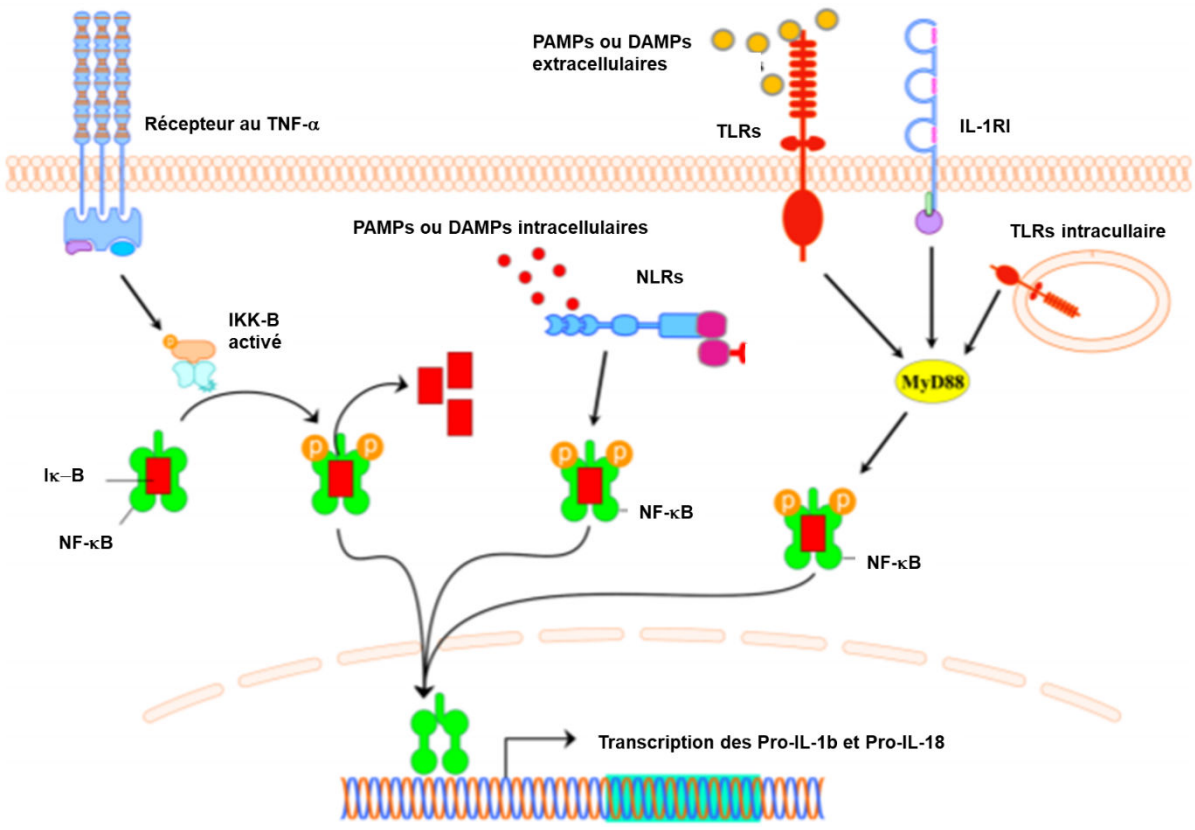


Figure 26 - Schéma illustrant l'activation de la voie NF-κB par les PRRs

Figure adaptée de Hanamsagar, Hanke, & Kielian, 2012.

L'activation de différents PRRs peut induire l'activation du facteur de transcription NF-κB. Cette activation induira la dissociation de son inhibiteur Iκ-B induisant ainsi sa translocation au noyau et l'activation de la transcription de ses gènes cible notamment la pro-IL-1β et la pro-IL-18.

Les NLRPs

La sous-famille des NLRPs compte à elle seule 14 membres : de NLRP1 à NLRP14. Leur domaine pyrine est impliqué dans l'interaction protéine-protéine assurant la liaison à l'adaptateur moléculaire ASC (Apoptosis-Associated Speck-like protein containing a CARD) (figure 23). Cet adaptateur permet la liaison du complexe à la caspase 1 et son oligomérisation (Hoss, 2017). Cette oligomérisation active la caspase 1 qui induit la maturation des cytokines pro-inflammatoires, IL-1β et IL-18.

La protéine NLRP1 est unique au sein de cette famille, incitant certains auteurs à suggérer son reclassement dans la sous-famille des inflammasomes NLRCs (Zhong, 2016). En effet, la présence d'un domaine CARD en C-terminal lui permet à la fois de recruter la protéine ASC puis la caspase 1 via son domaine PYD mais aussi de lier simultanément la caspase 5 (Martinon, 2002). Chez l'Homme, NLRP1 serait un senseur spécifique du Muramyl-Dipeptide et de la Toxine Létale de *Bacillus Anthracis*.

De même, NLRP10 présente une spécificité au sein de la famille des NLRPs. Cette protéine est dépourvue de son domaine LRR ; Son fonctionnement en tant qu'inflammasome canonique n'a jamais été démontré. Enfin, le postulat de certains auteurs est que la protéine NLRP10 serait un régulateur des NLRPs (Imamura, 2010), et notamment de NLRP3. Cependant, cette caractéristique est encore débattue à ce jour (Eisenbarth, 2012).

Il est important de noter que la plupart des NLRPs sont décrits pour posséder un rôle régulateur de l'inflammation en modulant l'activité du facteur nucléaire-κB (NF-κB) (Grenier, 2002 ; Manji, 2002 ; Wang, 2002). NF-κB est un facteur de transcription impliqué dans la régulation d'un grand nombre de processus biologiques et notamment les réponses immunitaire et inflammatoire physiologiques (Hayden, 2011) et tumorales (Perkins, 2012). Dans la plupart des cellules, la protéine NF-κB est cytoplasmique, complexée aux protéines inhibitrices Iκ-B qui lui confèrent un état inactif. NF-κB peut être activée par différents types de signaux, notamment pro-inflammatoires tels que le LPS ou l'IL-1β via leurs PRRs. Cette activation induit la phosphorylation puis la dissociation des protéines inhibitrices et la translocation de NF-κB au noyau pour activer la transcription de ses gènes cibles comme l'IL-1β et le TNF-α (figure 26) (Kim, 2016).

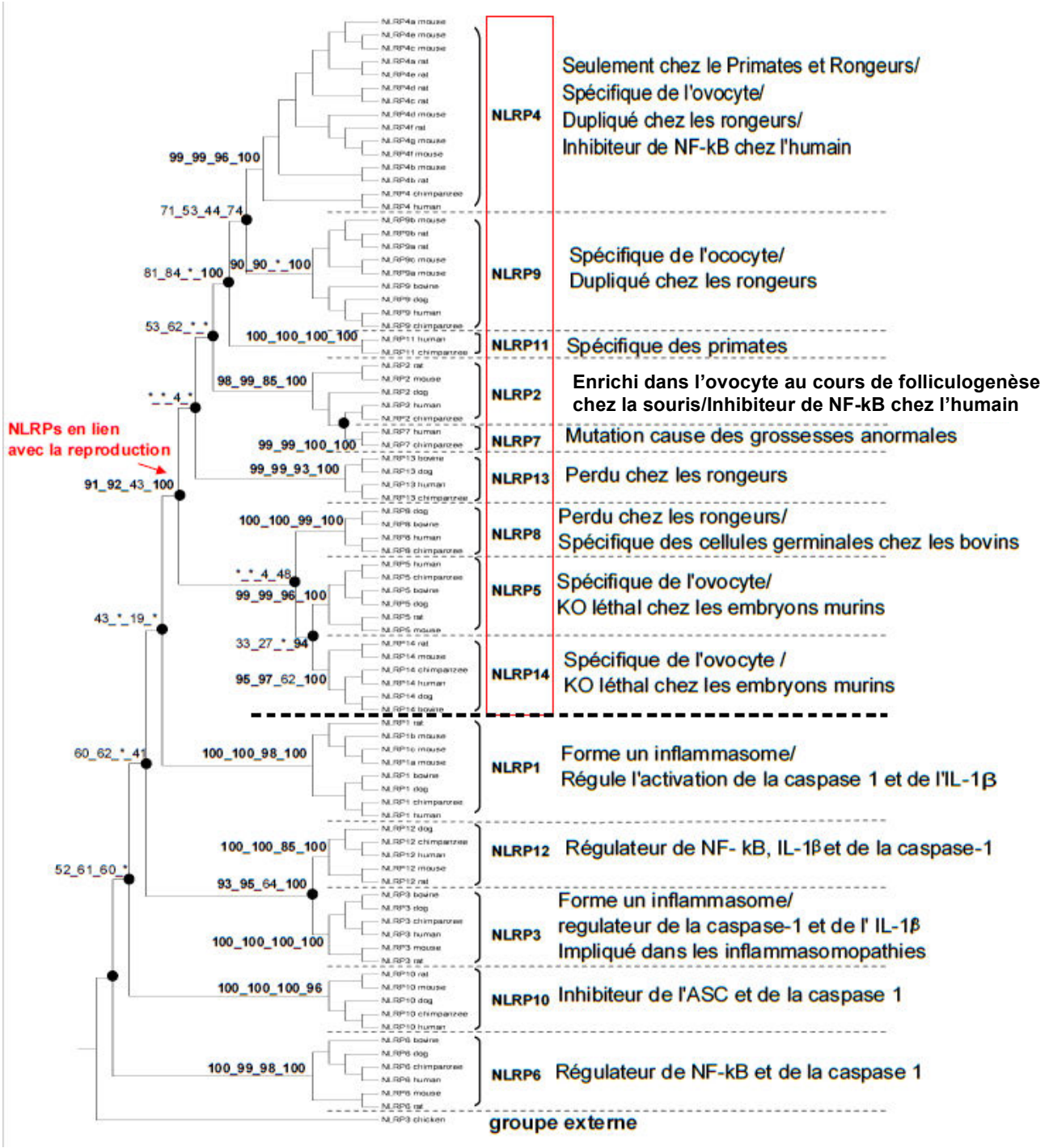


Figure 27 - Arbre phylogénétique consensus des NLRPs

Figure adaptée de Tian, 2009.

Construction de l'arbre phylogénétique après analyses selon quatre méthodes distinctes de 83 séquences NLRP appartenant à 6 espèces de mammifères différentes. La valeur de chaque nœud pour chacune des quatre méthodes d'analyse est notée en amont des nœuds.

Depuis leur découverte, les NLRPs ont été largement étudiés en rapport avec les processus physiopathologiques démontrant un rôle majeur des membres de cette famille dans la réponse immédiate du système immunitaire inné (Howell, 2018).

De façon intéressante, les travaux publiés à ce jour rapportent un lien étroit entre l'activité d'un grand nombre de NLRPs - comme NLRP4, 5, 8, 9 et 14 - et le système reproducteur, en particulier féminin (Tian, 2009). Les modèles animaux d'invalidation de NLRPs développés à ce jour ont mis en évidence des défauts de fertilité dus la plupart du temps à un blocage au cours du développement précoce de l'embryon (Tong, 2000). L'arbre phylogénétique faisant consensus, à ce jour, a permis de classer les gènes de cette famille (figure 27) selon 2 groupes : le premier associé à la reproduction est composé des NLRP2, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 13 et 14 ; le second dit non relié à la reproduction compte les NLRP1, 3, 6, 10 et 12. Ces derniers semblent principalement impliqués dans l'inflammation et la réponse immunitaire par la régulation d'autres acteurs comme le NF-kB, la caspase 1 et l'Il-1β (Tian, 2009).

De façon intéressante, l'analyse génétique et phylogénétique de la sous-famille des NLRPs a démontré que l'apparition du gène *NLRP7* résulte de la duplication du gène *NLRP2* au moment de la spéciation des primates (Tian, 2009). Les primates sont les seuls mammifères à exprimer ce gène ; la génération de modèles animaux génétiquement modifiés permettant d'étudier le rôle de la protéine NLRP7 *in vivo* est donc impossible.

2. B L' ASC, Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD

Commune aux inflammasomes, la protéine ASC est un adaptateur moléculaire. Cette protéine de 25 kDa se compose de deux domaines d'interactions protéine-protéine, un domaine PYD pour la liaison au PRR en N-terminal et un domaine CARD pour l'interaction à la caspase en C-terminal. Ces deux domaines sont décrits pour faciliter l'association des complexes multimoléculaires et l'activation des caspases (Radian, 2013).

2. C Les caspases

Les caspases appartiennent à la famille des protéases à cystéine reconnaissant chacune une séquence spécifique de certaines protéines. Elles sont activées par clivage et ont la capacité d'hydrolyser les liaisons peptidiques permettant la maturation des protéines. Ces enzymes jouent un rôle crucial au cours des phénomènes inflammatoires ainsi que dans les phénomènes d'apoptose (Man, 2016).

A ce jour, 12 caspases ont été identifiées chez l'Homme. Elles sont généralement classées en 2 groupes : les caspases liées à l'inflammation, représentées par les caspases 1, 4, 5, 11 et 12 et celles liées au phénomène d'apoptose. Ces dernières comptent les caspases 2, 8, 9 et 10. Ces caspases dites initiatrices de l'apoptose assurent le clivage des caspases 3, 6, 7 et 9 dites caspases effectrices car elles orchestrent le phénomène de l'apoptose (Man, 2016).

Des études récentes ont démontré que la caspase 8 serait impliquée dans les deux phénomènes grâce à son interaction avec certains PRRs (Man, 2013). Par ailleurs, la caspase 1 est spécifique des inflammasomes canoniques. Elle est activée par clivage et/ou oligomérisation au sein de l'inflammasome. Une étude récente suggère qu'elle possède la capacité de contrôler la durée d'activation des inflammasomes par auto-clivage de sa forme active en forme active instable (Boucher, 2018).

3. Les pathologies liées aux inflammasomes

De par leur fonction, les inflammasomes sont indispensables à la défense de l'organisme (Howell, 2018). Ainsi, les dérégulations de leur fonctionnement, en particulier celles causant un excès de sécrétion de cytokines, sont responsables du développement de pathologies inflammatoires et/ou métaboliques (Amin, 2017).

On peut distinguer deux types de pathologies associées à des défauts de fonctionnement des inflammasomes : ***i)*** celles directement liées à la présence de mutations des PRRs, dites inflammasomopathies et ***ii)*** celles causées par des dérégulations de l'expression et de l'activité des PRRs (Amin, 2017).

3. A Les principales inflammasomopathies

Les inflammasomopathies regroupent les pathologies auto-inflammatoires associées à des défauts dans la fonction de l'inflammasome. Il s'agit le plus souvent de mutations qui touchent les protéines de la machinerie résultant en un gain ou perte de fonction de l'activité de l'inflammasome (Amin, 2017).

Les mutations dans le gène codant la protéine NLRP3, sont associées à un groupe hétérogène de pathologies connues sous le nom de Syndrome Périodique Associé à la Cryopyrine (CAPS) ou cryopyrinopathies (Kuemmerle-Deschner, 2017). Ces pathologies regroupent l'urticaire familial au froid de type 1, le syndrome de Muckle-Wells et le syndrome CINCA/NOMID (syndrome chronique infantile neurologique cutané et articulaire néonatal). Ce dernier syndrome serait de loin le plus sévère.

Il est causé par une mutation dominante du gène *NLRP3* et est associé, chez le nourrisson, à une fièvre continue, des inflammations méningées stériles pouvant causer une surdité et des retards mentaux. Il peut aussi endommager, par des inflammations locales, les yeux et les muscles (Kuemmerle-Deschner, 2016). Ces symptômes sont liés à une activation continue de l'inflammasome NLRP3 qui engendre une production excessive d'IL-1β. Les agents bloquants de l'IL-1β, comme le Canakinumab ou de son récepteur comme l'Anakinra, sont actuellement les seuls traitements préconisés (De Benedetti, 2018). Ils présentent une action rapide et efficace pour supprimer les symptômes. Les CAPS sont des pathologies relativement rares ; elles ont été estimées à 1 cas pour 1 million aux USA et 1/360000 en Europe (Finetti, 2016).

D'autres inflammasomopathies telles que les AIFEC (Romberg, 2014 ; Rodrigues, 2018), les troubles auto-immuns associés au vitiligo ou encore les urticaires familiaux au froid de type 2 (Jeru, 2008) sont aussi liés à des mutations dominantes des gènes *NLRC4*, *NLRP1* ou *NLRP12* respectivement.

Bien que de nombreuses mutations aient été rapportées pour le gène *NLRP7*, les pathologies qui leurs sont associées ne correspondent pas, sur le plan clinique, à des inflammasomopathies. Il s'agit de mutations récessives homozygotes ou hétérozygotes composites pour lesquelles le phénotype associé correspond à des défauts de la reproduction chez la femme et en particulier le développement de môles hydatiformes (Murdoch, 2006). Les patientes ne présentent pas de troubles auto-immuns ou d'inflammation chronique (*cf.* : chapitre II.1.A Môles hydatiformes et Chapitre III.4 focus sur la protéine NLRP7).

3. B Les pathologies liées à des dérégulations d'expression des inflammasomes

L'expression quasi-ubiquitaire des inflammasomes a incité plusieurs groupes de recherche à investiguer sur leur implication potentielle dans la genèse et/ou la progression de nombreuses pathologies. L'inflammasome NLRP3 est le plus étudié et on sait actuellement qu'il est associé au développement de multiples pathologies. Ces dernières incluent le diabète de type 2, l'athérosclérose et la goutte (Amin, 2017) ainsi que la maladie Alzheimer (Tan, 2013). De façon intéressante, des dérégulations dans la fonction de l'inflammasome NLRP3 ont aussi été rapportées dans les pathologies de la grossesse. Celles–ci incluent la PE, principale pathologie de la grossesse, le RCIU ainsi que la prématurité (Soellner, 2018 ; Brien, 2017 ; Modi, 2017 ; Gomez-Lopez, 2018). Seules ces dernières seront développées dans ce manuscrit car elles font l'objet de l'axe de recherche développé au cours de ma thèse.

La pré-éclampsie

Bien qu'aucune mutation des NLRPs n'ait été rapportée dans la PE, plusieurs études ont démontré leur implication dans le développement de cette pathologie (Soellner, 2018). Les niveaux d'expression de NLRP1 et NLRP3 sont notamment significativement plus élevés dans les monocytes de patientes pré-éclamptiques (Matias, 2015). Au niveau local, dans le placenta, NLRP3 est également significativement plus exprimée. Cette augmentation est associée à une sécrétion plus importante d'IL-1β en réponse à l'activation de l'inflammasome NLRP3. De plus, il est important de noter que la PE est associée à un taux placentaire élevé d'acide urique, (DAMPs) molécule directement impliquée dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Stodle, 2018). D'autre part, il a été démontré que les vésicules extracellulaires massivement produites par les placentas pré-éclamptiques induisent un phénomène thrombo-inflammatoire dans les trophoblastes à l'interface fœto-maternel, responsable de l'activation du NLRP3 (Kohli, 2016). En effet, les vésicules extracellulaires du placenta PE induisent une accumulation de plaquettes et un relargage d'ATP important dans les vaisseaux placentaires. Or, l'ATP libre dans la cellule constitue aussi un DAMP spécifique de l'inflammasome NLRP3 conduisant à son activation et à l'induction des phénomènes inflammatoires décrits dans la pathologie de la pré-éclampsie (Kohli, 2016).

Le retard de croissance intra-utérin

Le RCIU, souvent idiopathique, a été rapporté comme pathologie étroitement associée à une inflammation placentaire (Kovo, 2013 ; Cotechini, 2014). En l'absence d'infection dans cette catégorie de RCIU, l'implication de l'inflammasome NLRP3 est suspectée. A ce jour, seule une étude suggère une implication directe de l'inflammasome NLRP3 dans le RCIU. Elle démontre que l'exposition placentaire à l'urate monosodique induit une inflammation excessive médiée par cet inflammasome et conduit, *in vivo,* à un RCIU chez la ratte gestante (Brien, 2017).

La prématurité

Des études récentes basées sur le séquençage complet de l'exome ont analysé plusieurs cohortes de patientes ayant présenté des cas de travail spontané prématuré. Ces études ont démontré qu'au moins une partie des cas pourrait être classée dans le groupe des inflammasomopathies (Modi, 2017). En effet, il ressort de ces études qu'une fraction non négligeable de patientes sont porteuses de mutations affectant la séquence exonique de gènes codant pour des inflammasomes (ex : NLRP10, NLRP12, NOD2, TLR10) (Modi, 2017).

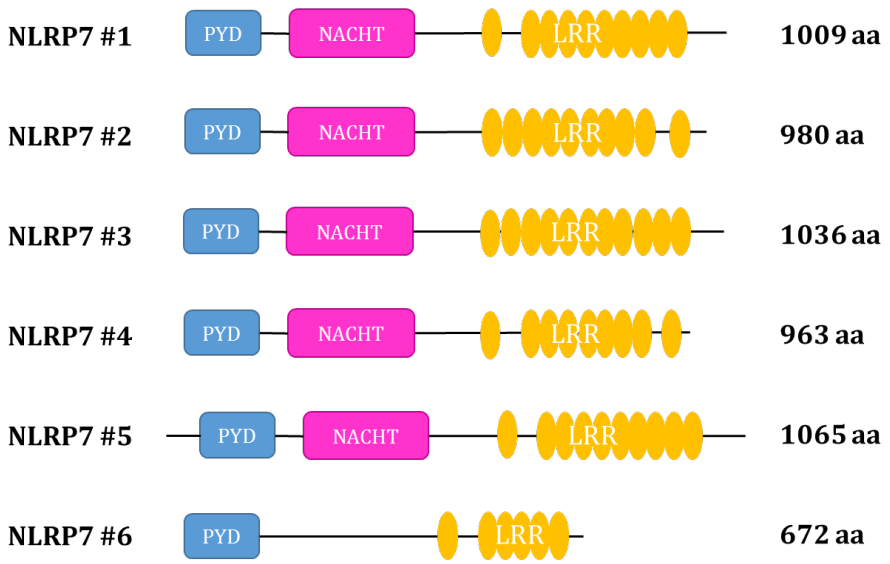


Figure 28 - Variants protéiques de la protéine NLRP7

Structure protéique des 6 variants de la protéine NLRP7. PYD : Pyrine Domain ; NACHT Domain ; LRR : Leucin Rich Repeats Domain.

Ces résultats suggèrent fortement que l'inflammation décrite dans les cas d'accouchements prématurés spontanés pourrait être liée à l'activation de certains inflammasomes par des particules d'origine infectieuses ou stériles (ex : stress cellulaire, nécrose). Cette hypothèse est soutenue par d'autres études qui ont démontré l'activation des inflammasomes dans des cas de naissances prématurées (Gomez-Lopez, 2018).

L'ensemble des données collectées à ce jour sur le rôle des inflammasomes dans la physiologie et dans le développement de certaines pathologies suggère fortement leur considération en tant que cibles préférentielles d'investigation. La modulation de l'activité des inflammasomes représente un nouvel espoir dans la recherche de traitement des pathologies majeures de notre siècle que sont le cancer, le diabète et les pathologies neurodégénératives, telles que les maladies de Parkinson et d'Alzheimer, ainsi que celles en lien avec la reproduction.

4. Focus sur la protéine NLRP7

La protéine NLRP7 est codée par le gène du même nom situé sur le chromosome 19 au locus q13.42. Ce gène comporte 11 exons dont 10 codants et est issu de la duplication du gène *NLRP2* après la spéciation des primates. De ce fait, il n'existe pas chez les autres espèces de mammifères notamment les muridés (Murdoch, 2006). Son produit de transcription est soumis au processus d'épissage alternatif : 6 isoformes de la protéine sont référencées dans les bases de données (figure 28). La traduction de la séquence codante dans sa totalité donne une protéine de 1037 acides aminés pour un poids moléculaire de 115 kDa. On peut la retrouver dans la littérature sous le nom de : NALP7, NOD12, PAN7, PYPAF3 (PYRIN-containing Apaf1-like protein 3), HYDM ou encore CLR19.4.

4. A Expression et régulation

L'expression du gène *NLRP7* a été mise en évidence dans de nombreux tissus, tels que le testicule, le placenta ou encore les embryons préimplantatoires. Au niveau cellulaire, NLRP7 a été majoritairement rapportée et étudiée dans les lymphocytes (Okada, 2004 ; Mahadevan, 2014 ; Messaed, 2011). NLRP7 semble avoir de multiples localisations subcellulaires. Cette protéine a été décrite comme essentiellement exprimée dans le cytoplasme avec d'occasionnelles translocations et agrégations dans le noyau (Khare, 2012 ; Singer, 2015 ; Singer, 2014). Ces translocations sont confortées par la présence d'un signal de localisation nucléaire (NLS) au sein de son domaine NACHT. De plus, NLRP7 est décrit comme interagissant avec des facteurs nucléaires impliqués dans la méthylation de l'ADN (Mahadevan, 2014) et la régulation de l'expression de certains gènes cibles (Singer, 2015).

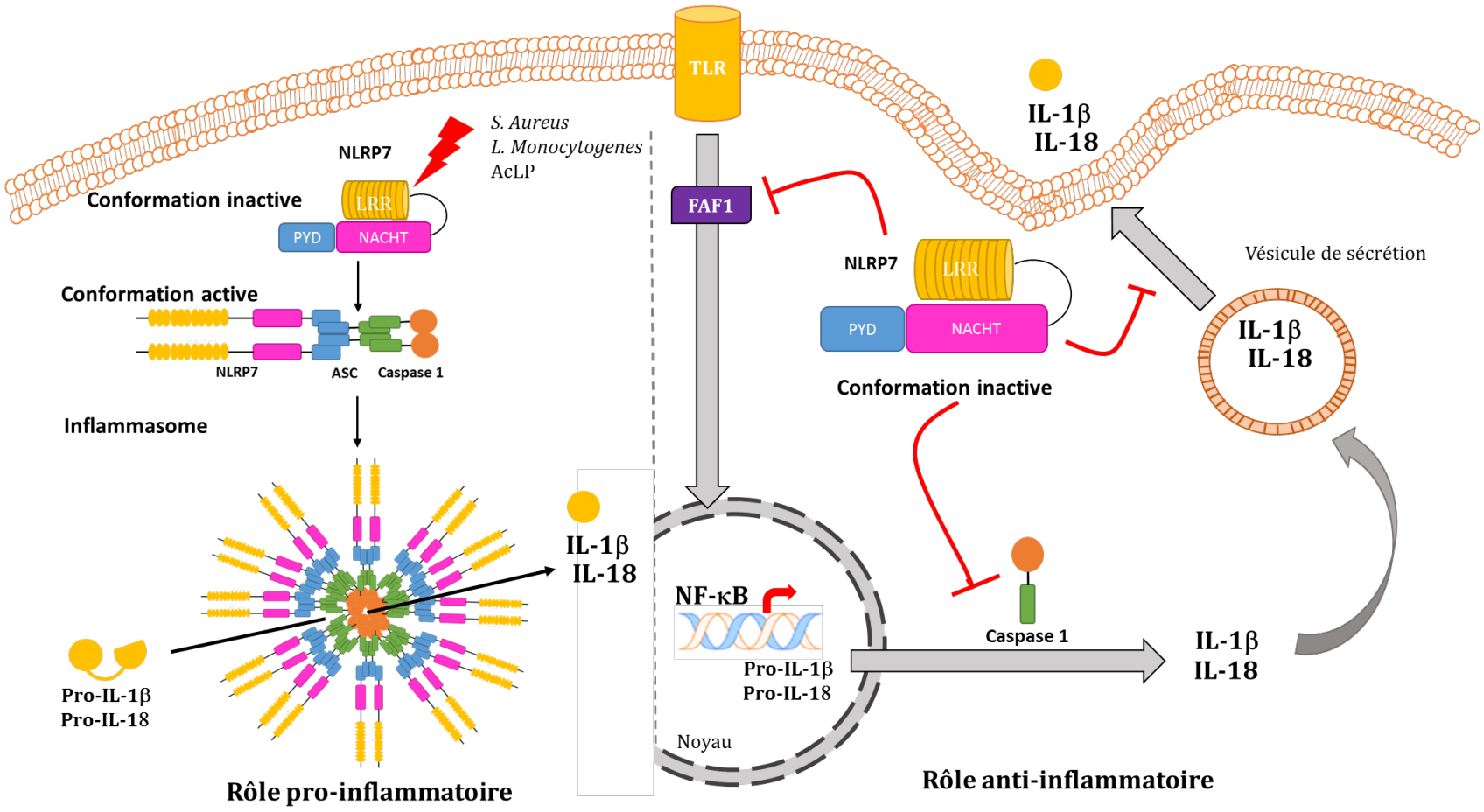


Figure 29 - Schéma consensus des activités pro- et anti-inflammatoires de la protéine NLRP7

Figure inspirée de Ratsimandresy, 2013 et Radian, 2015.

Mécanismes d'action opposés proposés pour la protéine NLRP7. L'activation intracellulaire de NLRP7 conduit à son association à la protéine ASC et à l'activation de la caspase 1. Le complexe ainsi formé permet la maturation des cytokines pro-inflammatoires, IL-1β et IL-18. D'autre part, en conformation inactive, NLRP7 aurait un rôle anti-inflammatoire inhibant la maturation et / ou la sécrétion des cytokines pro-inflammatoire. Cette inhibition pourrait s'exercer à différents niveaux de régulation. La protéine NLRP7 pourrait inhiber la translocation au noyau du facteur de transcription NF-Kb et inhiber la transcription des gènes des cytokines pro-inflammatoire. Elle pourrait également inhiber la maturation de la caspase 1 et par conséquent inhiber la maturation des cytokines. Enfin, elle pourrait également inhiber le trafic vésiculaire et ainsi bloquer la sécrétion des cytokines.

De manière intéressante, NLRP7 semble avoir la capacité d'interagir avec le répresseur de la transcription ZBTB16 et d'initier un rétrocontrôle négatif de sa propre transcription (Singer, 2015).

4. B Rôle dans l'inflammation

Deux fonctions inflammatoires opposées ont été rapportées pour la protéine NLRP7 (Khare, 2012 ; Kinoshita, 2005). En effet, NLRP7 est décrite pour former un inflammasome qui, une fois activé, conduit à la sécrétion d'IL-1β . Ce phénomène est compatible avec un rôle pro-inflammatoire de NLRP7 (Kinoshita, 2005). A l'inverse, NLRP7 est aussi décrite comme responsable de l'inhibition de la sécrétion d'IL-1β dépendante de la caspase1 (Khare, 2012). Les mécanismes d'action opposés proposés pour la protéine NLRP7 sont rapportés dans la figure 29.

4. B.a Rôle Pro-inflammatoire de la protéine NLRP7

Le rôle pro-inflammatoire de la protéine NLRP7 s'inscrit dans le consensus classique de fonctionnement établi pour les NLRPs. Différents agonistes sont décrits pour déclencher l'activation de NLRP7 tels que *Staphylococcus Aureus* ou encore *Listeria Monocytogenes* ; mais ceux-ci ne sont pas spécifiques de NLRP7 car ils peuvent également activer d'autres inflammasomes. A titre d'exemple, *L. Monocytgenes* peut également activer les inflammasomes NLRC4, NLRP3 et AIM2. Les seuls PAMPs décrits comme spécifiques de l'inflammasome NLRP7 sont les lypopeptides acétylés d'origine bactérienne (acLP) (Radian, 2013).

Comme illustré dans la figure 29, la reconnaissance des acLP par la protéine NLRP7 induit son activation conduisant à un changement dans sa conformation. Une fois activée, NLRP7 forme un inflammasome grâce à sa liaison à l'ASC et à la Caspase 1 qui permettent la maturation de la pro-IL-1β et de la pro-IL-18.

4. B.b Rôle anti-inflammatoire de la protéine NLRP7

Les données de la littérature suggèrent que dans les cellules quiescentes, la protéine NLRP7 est dans une conformation dite inactive (Radian, 2015). Le domaine LRR est replié sur le domaine NACHT, la protéine NLRP7 ne peut donc être complexée aux autres protéines de l'inflammasome. Elle exercerait dans ce cas une fonction inflammasome indépendante.

Entre autre fonction, il semble que la protéine NLRP7 inactive soit un régulateur négatif de l'inflammation en diminuant la sécrétion d'IL-1β. En effet, plusieurs études ont démontré que la surexpression de NLRP7 dans les cellules humaines induit une inhibition de la sécrétion d'IL-1β (Messaed, 2011 ; Khare, 2012).

Son rôle régulateur s'exercerait à différents niveaux ; elle pourrait être un inhibiteur de la transcription du gène codant pour l'IL-1β en empêchant l'activation du facteur de transcription NF-kB. Le mécanisme par lequel NLRP7 inhiberait l'activation de ce facteur de transcription n'a pas encore été élucidé. Cependant, des expériences de co-immunoprecipitation ont permis de mettre en évidence une interaction entre la protéine NLRP7 et la protéine FAF1 connue pour inhiber la translocation au noyau de la protéine NF-kB (Kinoshita, 2006). Le rôle inhibiteur de la protéine NLRP7 pourrait également s'exercer par l'inhibition de la maturation des pro-caspase 1 et pro-IL-1β à travers une interaction avec ces protéines avant l'étape de l'activation de l'inflammasome (Radian, 2015).

Ces modes d'inhibition sont remis en question par l'étude de Messaed et al. en 2011. Cette étude a démontré que la maturation de l'IL-1β dans des cellules issues de patientes porteuses de mutations de la protéine NLRP7 n'était pas affectée (Messaed, 2011). En effet, les cellules de ces patientes présentent des taux intracellulaires de pro-IL-1β et d'IL-1β mature normaux voir supérieurs aux taux retrouvés dans les cellules non mutées. Cependant, ces cellules ont perdu la capacité à sécréter cette interleukine. De par sa localisation au niveau de l'appareil de Golgi, les auteurs ont émis l'hypothèse selon laquelle NLRP7 pourrait exercer un rôle anti-inflammatoire en affectant le trafic vésiculaire et notamment la sécrétion d'IL-1β. A l'heure actuelle, le mécanisme précis par lequel NLRP7 affecte le trafic vésiculaire reste à démontrer.

4. C Rôle de NLRP7 dans le cancer

Très peu d'études ont rapporté l'implication de NLRP7 dans le développement du cancer. L'étude d'Ohno et al. en 2008 a démontré que le niveau d'expression de cette protéine est corrélé au degré d'invasion tumoral et au mauvais pronostic du cancer de l'endomètre (Ohno, 2008). Par ailleurs, NLRP7 a été rapportée comme surexprimée dans le cancer testiculaire. Dans ce cancer, la protéine NLRP7 jouerait un rôle crucial dans la tumorigenèse, notamment dans la prolifération des cellules germinales tumorales (Okada, 2004).

4. D Rôle dans la spermatogénèse

Bien que la protéine NLRP7 soit exprimée dans les testicules (Okada, 2004), elle ne semble pas jouer un rôle critique dans la spermatogénèse. Il ressort des études de pédigrés des familles sujettes aux BiMH que tous les hommes présentant des mutations bi-alléliques du gène *NLRP7* ont une fertilité normale (Wang, 2009). Cependant, en raison du faible nombre de cas présents dans ces études, ces résultats restent à confirmer.

4. E Rôle dans l'ovogénèse et l'acquisition de l'empreinte parentale

Le gène *NLRP7* est un des premiers gènes à effet maternel à avoir été identifié (Murdoch, 2006). Les gènes à effet maternel sont transcrits durant l'ovogénèse et stockés dans l'ovocyte afin de permettre le développement embryonnaire précoce jusqu'à l'activation de son propre génome sur les plans transcriptionnels et traductionnels. NLRP7 est exprimée durant l'ovogénèse jusqu'en Méiose I et est essentielle à la maturation de l'ovocyte. Elle est présente principalement dans la région corticale au niveau du cytosquelette où elle colocalise avec la protéine KHDC3L, également issue d'un gène à effet maternel et impliquée dans le développement des BiMH. En revanche, à partir du stade blastocyste, ces protéines sont redistribuées à l'extérieur de la région corticale de façon homogène au sein du cytoplasme pour NLRP7 et du noyau pour KHDC3L (Akoury, 2015).

Les études des niveaux d'expression, de la localisation et du rôle de la protéine NLRP7 au sein de l'ovocyte et de l'embryon précoce ont conduit certains auteurs (Monk, 2017) à émettre l'hypothèse selon laquelle la protéine NLRP7 appartiendrait au complexe maternel sous-cortical (SCMC). Le SCMC est un complexe multi-protéique exprimé dans les ovocytes et les embryons préimplantatoires (Bebbere, 2016) dont le rôle physiologique précis reste à élucider. De multiples expériences d'invalidation des protéines impliquées dans le SCMC chez la souris ont mis en évidence des problèmes de stérilité secondaires (Tashiro, 2010 ; Li, 2008). En effet, il n'a pas été rapporté de dérégulations dans la folliculogénèse ou dans l'ovulation, ni d'impact sur la fécondation ou la réceptivité endométriale. Chez ces animaux, le développement embryonnaire s'arrête au moment du clivage du zygote (Tong, 2000). Ce rôle critique dans le clivage de l'embryon serait lié au contrôle de la mise en place du cytosquelette cellulaire par l'intermédiaire de la régulation dynamique du réseau d'actine sous cortical, responsable des divisions cellulaires symétriques (Yu, 2014).

A ce jour, seules 4 protéines formant ce complexe ont été décrites (Monk, 2017). Elles sont toutes codées par des gènes à effet maternel décrits comme étant associés à de multiples défauts de la reproduction. De façon intéressante, on retrouve au sein de ce complexe, NLRP5 qui serait associée à de rares cas de MHC mais également aux fausses couches récurrentes et aux morts in utéro, ainsi que KHDC3L associée au développement des BiMH. Cependant, une étude biochimique s'intéressant à ce complexe a démontré que son poids moléculaire est largement supérieur aux poids moléculaires combinés des 4 protéines qui le constituent (Li, 2008 ; Li, 2008 b). Ces résultats suggèrent que d'autres partenaires sont impliqués.

De plus, comme dans le cas des biMH, les mutations des gènes *NLRP5* et *KHDC3L* sont associées à d'importantes dérégulations de l'empreinte parentale (Docherty, 2015 ; Judson, 2002 ; *cf.* Chapitre II.1.A Les Moles Hydatiformes).

L'empreinte parentale est un mécanisme épigénétique qui conduit à l'expression d'une seule version d'un gène en fonction de son origine parentale. Ceci signifie que les cellules somatiques ont un allèle transcriptionnellement actif et un allèle réprimé pour ce gène (Monk, 2015). Il a récemment été démontré que NLRP7 a un rôle direct dans la régulation de l'acquisition de l'empreinte parentale. Ce rôle serait inflammasome indépendant (Mahadevan, 2014 ; Nguyen, 2014). Il est donc possible que le SCMC comprenne également NLRP7 et régule la localisation et la translocation au noyau des facteurs épigénétiques au cours de l'ovogénèse (Monk, 2017).

4. F Rôle dans le développement préimplantatoire

L'étude de Zhang *et al.* en 2008 suggère un rôle des NLRPs dans le développement préimplantatoire des embryons humains suite à la mise en évidence d'une diminution importante de l'expression de ces protéines dans les ovocytes et embryons anormaux (Zhang, 2008). Cette étude a également démontré que le niveau des transcrits NLRP7 diminue jusqu'au 3e jpf puis augmente de façon importante au moment de l'activation du génome embryonnaire, entre le 3e et le 5e jpf. Cette étude est en accord avec celle de Monk *et al.* 2017, qui propose NLRP7 comme acteur potentiel du clivage de l'embryon via la régulation du cytosquelette sous cortical (Monk, 2017).

4. G Rôle dans la placentation

Plus de la moitié des gènes soumis à l'empreinte parentale ont un rôle dans la prolifération et sont spécifiques du tissu placentaire (Hui, 2017). Le dogme du « conflit parental » veut que les gènes exprimés d'origine paternelle soient en faveur du développement placentaire, tandis que ceux d'origine maternelle le limiteraient au profit du développement de l'embryon (Haig, 2006). NLRP7 étant un acteur de la régulation de l'empreinte parentale, il pourrait donc outre son implication dans la survenue des MH, avoir un rôle dans le contrôle du développement physiologique du placenta.

A ce jour, très peu d'études se sont intéressées au rôle de cette protéine dans le développement placentaire. Une étude intéressante publiée par Mehadevan et al. en 2014 a démontré que NLRP7 est impliquée dans le lignage des cellules trophoblastiques *in vitro*. En effet, la diminution d'expression de la protéine dans des cellules souches humaines a induit une accélération de la différenciation trophoblastique des cellules ainsi qu'une augmentation de la sécrétion de la β-hCG par celles-ci (Mahadevan, 2014).

Récemment, il a aussi été démontré que la protéine NLRP7 est impliquée dans le processus de décidualisation. NLRP7 est surexprimée dans les cellules déciduales d'échantillons d'endomètre collectés au premier trimestre de la grossesse. Ces échantillons ont été comparés aux échantillons de décidue collectés chez des patientes non enceintes (Huang, 2017).

L'inhibition de l'expression du gène NLRP7 dans les cellules stromales endométriales bloque le processus de décidualisation *in vitro*. Cet effet serait médié par l'inhibition de l'expression de la protéine IGFBP1, Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein 1. Les auteurs de ce travail ont également démontré que la surexpression de NLRP7 dans ces mêmes cellules induit l'augmentation de l'expression de protéines impliquées dans le processus de décidualisation. NLRP7 participerait au contrôle du processus de décidualisation suite à sa translocation dans le noyau et à l'induction de l'activité transcriptionnelle du récepteur à la progestérone (Huang, 2017). Ils suggèrent donc un rôle de NLRP7 en tant que co-facteur de transcription du récepteur à la progestérone impliqué dans le processus de décidualisation.

Ces résultats sont en accord avec l'étude de Singer *et al.* publiée en 2015 démontrant la capacité NLRP7 à interagir avec des facteurs de transcription impliqués dans la modulation de l'expression de gènes cibles (singer, 2015), notamment de la décidualisation (Huang, 2017). Ces travaux mettent en lumière un rôle intracellulaire inflammasome indépendant de cette protéine.

L'ensemble de ces données démontre que NLRP7 joue rôle important dans le contrôle des processus précoces clés du développement embryonnaire et suggère fortement son implication dans le contrôle des processus développementaux du placenta humain.

Objectif du Projet de thèse

J'ai réalisé mes travaux de thèse au sein du laboratoire de Biologie du Cancer et de l'Infection au CEA de Grenoble. Le laboratoire, dirigé par le Dr Jean-Jacques Feige, compte trois équipes de recherche dont l'équipe IMAC – *Invasion Mechanisms in Angiogenesis and Cancer,* à laquelle je suis rattachée. Le groupe créé par le Dr Nadia Alfaidy, directrice de ma thèse, au sein de cette équipe s'intéresse au mécanisme de l'invasion trophoblastique dans un contexte physiologique et pathologique.

Dès l'origine de la création de son groupe en 2005, le Dr Alfaidy s'est intéressée à l'étude du facteur croissance *Endocrine Gland-derived Vascular Endothelial Growth Factor* (EG-VEGF) au cours de la placentation physiologique et pathologique. Les premiers travaux de son groupe ont concerné l'étude de l'invasion trophoblastique superficielle dans les pathologies de la Pré-éclampsie et du retard de croissance intra-utérin. En 2013, dans le contexte de la thèse du Dr Wael Traboulsi, le groupe s'est intéressé au rôle de ce facteur placentaire dans le développement des maladies gestationnelles trophoblastiques, associée à une invasion excessive des trophoblastes.

Au cours de ces travaux de thèse, le Dr Traboulsi a pu mettre en évidence l'implication de l'EG-VEGF dans les phénomènes de développement et de progression des môles hydatiformes et du choriocarcinome (Traboulsi, 2017). D'autre part, face à l'absence de véritables modèles animaux mimant le choriocarcinome gestationnel chez la souris, le groupe a développé un modèle murin de choriocarcinome gestationnel orthotopique (Technologie protégée par l'INSERM). En effet, jusqu'à lors, il existait un modèle de tumeur primaire consistant en l'injection sous-cutanée de cellules tumorales chez des souris non gravides immunodéficientes et un modèle métastatique consistant en l'injection intraveineuse de cellules tumorales, là encore chez la souris non gravide immunodéficiente. La principale critique de ces deux modèles est l'absence d'influence de l'environnement placentaire et de l'imprégnation physiologique induite par la grossesse sur le développement et la progression tumorale chez les animaux. Le modèle développé par le Dr Traboulsi consiste en l'injection de cellules tumorales de choriocarcinome humain directement dans la décidue maternelle de placenta murin à 7,5 dpc et leur analyse à 19,5 dpc.

Forts de cette découverte et de la mise en place d'un modèle d'étude pertinent du développement et de la progression du choriocarcinome *in vivo*, nous avons souhaité poursuivre l'étude du développement et de la progression des môles hydatiformes et du choriocarcinome à travers la caractérisation du rôle de la protéine NLRP7. En effet, les mutations du gène codant pour cette protéine, appartenant à une famille de protéine capable de former des inflammasomes, ont été décrites comme étroitement associées au développement des môles hydatiformes complètes (Murdoch, 2006). Les MHC sont des tumeurs placentaires bégnines associées dans 20 % des cas à la survenue d'un choriocarcinome (Noal, 2010). Bien que la littérature s'enrichisse de plus en plus quant à la mise en évidence de nouvelles mutations du gène *NLRP7* dans les MHC, très peu de données existent concernant le rôle de cette protéine au cours de la placentation physiologique et pathologique.

Ainsi, mon projet de thèse a concerné l'étude du rôle de la protéine NLRP7 dans les placentations normale et pathologique selon trois grands axes :

- ✓ *Etude clinique* : Statut de l'inflammasome NLRP7 chez les patientes ayant des grossesses môlaires et choriocarcinomateuses,
- ✓ *Etude in vitro / ex vivo :* Caractérisation du rôle de la protéine NLRP7 dans les placentas normal et tumoral,
- ✓ *Etude in vivo :* Implication de la protéine NLRP7 dans le développement et la progression du choriocarcinome *in vivo*.

L'étude du rôle de la protéine NLRP7 dans la placentation normale a été possible grâce à l'accès aux tissus placentaires frais collectés au premier trimestre de la grossesse au CHU de Grenoble. Ces collectes nous ont permis de réaliser des études de cultures primaires en 2D (cultures primaires de trophoblastes) et 3D (explants placentaires). Nous avons également travaillé sur la lignée cellulaire non tumorale de cytotrophoblaste (HTR8/SVneo) et les lignées tumorales, issues d'une métastase cérébrale de choriocarcinome (BEWO ; JEG3).

Il nous a semblé intéressant, suite à nos premiers résultats dans un contexte non tumoral, d'explorer l'implication de la protéine NLRP7 dans la pathologie du RCIU. Pour cela, nous avons collaboré avec le Pr Marie-Noëlle Dieudonné et le Dr Padma Murthi pour l'accès à des cohortes bien documentées de tissus placentaires et sera de patientes. L'étude du rôle de la protéine NLRP7 dans le contexte tumoral a nécessité des collaborations plus larges, avec le Dr T. Aboussaouira du CHU de Casablanca (Maroc), le Dr PA. Bolze du centre de référence Français des maladies gestationnelles trophoblastiques (Lyon) et le Dr R. Slim de l'université Mc Gill (Canada), du fait de la rareté des échantillons du choriocarcinome.

Enfin pour l'étude du rôle de la protéine NLRP7 *in vivo,* nous avons développé une lignée tumorale stable sous-exprimant la protéine (stratégie ShRNA) que nous avons injectée chez les souris SHO-SCID gestantes en orthotopique (modèle *in situ* développé par notre groupe) et chez la souris SHO-SCID non gestante soit dans la corne utérine, modèle de tumeur primaire sans participation de l'imprégnation physiologique de la grossesse, soit dans la veine de la queue, modèle métastatique.

Résultats

Article 1

La protéine NLRP7 joue un rôle critique dans la différenciation trophoblastique et est impliquée dans le retard de croissance intra-utérin

I. Contexte et présentation de la publication

La protéine NLRP7 appartient à la famille des protéines NLRs capables de former des inflammasomes. Cette protéine est principalement étudiée dans le contexte de l'inflammation, en lien avec sa fonction d'inflammasome. Les études de la littérature rapportent une dualité concernant le rôle de protéine NLRP7 dans l'inflammation. En effet, plusieurs études ont démontré que la protéine NLRP7 a la capacité d'être activée et d'induire la sécrétion de l'IL-1β, exerçant donc une fonction pro-inflammatoire (Kinoshita, 2005). A l'inverse, un rôle de régulateur négatif de la sécrétion de l'IL-1β a pu également être mis en évidence (Khare, 2012 ; Messaed, 2011), démontrant une action anti-inflammatoire inflammasome indépendante.

L'intérêt de l'étude de la protéine NLRP7 dans la reproduction, en particulier féminine, a été mis en évidence en 2006. En effet, les mutations du gène codant pour la protéine NLRP7 ont été rapportées comme étroitement associées au développement de grossesses anormales (Qian, 2007), en particulier les môles hydatiformes (Murdoch, 2006). Les études qui ont suivies se sont intéressées à son rôle dans le développement de ces pathologies à travers l'étude de son rôle dans l'acquisition de l'empreinte parentale (Nguyen, 2014 ; Mahadevan, 2014), dans l'ovogénèse (Akoury, 2015 ; Monk, 2015) et le développement pré-implantatoire (Zhang, 2008 ; Monk, 2017).

Très peu d'études se sont intéressées au rôle de cette protéine dans les développements placentaires normal et pathologique. L'étude de Mehadevan *et al.* a démontré en 2014 que NLRP7 serait impliquée dans le lignage trophoblastique des cellules souches humaines (Mahadevan, 2014). A ce jour, aucune étude n'a démontré le rôle de cette protéine dans la différentiation trophoblastique, paramètre majeur du développement placentaire au cours du premier trimestre de la grossesse.

Dans ce travail, notre objectif initial était de caractériser le rôle physiologique de la protéine NLRP7 au cours du premier trimestre de la grossesse. En collaboration avec le CHU de Grenoble, nous avons collecté 54 échantillons de placenta au premier trimestre de la grossesse entre 6 et 14 SA. Ces tissus nous ont permis de déterminer ***i)*** la période d'expression physiologique de la protéine NLRP7, ***ii)*** les types cellulaires exprimant la protéine, ***iii)*** le rôle de NLRP7 dans l'invasion trophoblastique grâce à la mise en place de culture d'explants placentaires (système 3D), ainsi que ***iv)*** le rôle de NLRP7 dans la différenciation trophoblastique sur des trophoblastes primaires isolés à partir de placenta humain de premier trimestre. Ce dernier résultat a été confirmé sur la lignée syncytiotrophoblastique, BEWO. Aussi, nous avons utilisé la lignée cellulaire cytotrophoblastique invasive et non tumorale, HTR8/SVneo. Grâce au travail sur cette lignée, nous avons démontré que l'expression de NLRP7 est régulée par deux paramètres majeurs de la placentation : l'hypoxie et la β-hCG et que NLRP7 contrôle la prolifération et la migration trophoblastique.

Au vu des résultats obtenus, un second objectif s'est imposé. Ce dernier a concerné la caractérisation du statut de la protéine NLRP7 dans le RCIU, pathologie de la grossesse associée à des défauts du développement placentaire avec des conséquences sur la progression normale de la grossesse. Cette étude a été motivée par une étude récente de la littérature qui a démontré l'implication d'une autre protéine appartenant à la sous-famille des NLRPs, NLRP3, dans le développement de la pathologie du RCIU (Brien, 2017). De plus, cette pathologie avait déjà été rapportée comme étroitement associée à une inflammation excessive en l'absence d'infection sous-jacente (Kovo, 2013 ; Cotechini, 2014).

En collaboration avec le Dr Padma Murthi « Université de Melbourne » et le Pr Marie-Noëlle Dieudonné « Université de Versailles – Saint Quentin », nous avons bénéficié de deux cohortes de sera et de tissus placentaires bien documentés. Ce matériel nous a permis de caractériser le statut de la protéine NLRP7 ainsi que celui des protéines de la machinerie des inflammasomes (ie. ASC, Caspase 1, Il-1β et IL-18) dans le RCIU. Ces caractérisations ont été réalisées au niveau local dans les placentas et au niveau systémique chez les patientes.

L'ensemble des résultats obtenus dans cette étude est reporté dans la publication qui suit. Cette publication est actuellement en révision favorable dans le journal « Journal of Molecular Medicine ». J'ai réalisé ce travail en étroite collaboration avec le Dr Roland Abi-Nahed qui était en stage post doctoral au sein de l'équipe pendant la période de ma thèse.

NLRP7 is increased in human idiopathic fetal growth restriction and plays a critical role in trophoblast differentiation.

R. Abi Nahed[1,2,3], D. Reynaud[1,2,3], A. J Borg[5], W. Traboulsi[1,2,3], A. Wetzel[2,8], V. Sapin[9], S. Brouillet[1,2,8], MN Dieudonné[6], M. Dakouane- Giudicelli[7], M. Benharouga[2,3,4], P. Murthi[5], N. Alfaidy [1,2,3]

Brief title: NLRP7 is deregulated in FGR

1. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 1036, Grenoble, France
2. Université Grenoble-Alpes, 38000, Grenoble, France
3. Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA), Biosciences and Biotechnology Institute of Grenoble, Grenoble, France
4. Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 5249, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, Grenoble, France
5. Department of Medicine, School of Clinical Sciences, Monash university and the Ritchie Centre, Hudson Institute of Medical Research, Clayton, Victoria, Australia and Department of Obstetrics and Gynaecology, The University of Melbourne, Parkville, Victoria, Australia (PM) and Department of Maternal-Fetal Medicine, pregnancy Research Centre, The Royal Women's Hospital, Parkville, Victoria, Australia. (PM and AJB)
6. GIG - EA 7404 Université de Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines, Université Paris-Saclay, Unité de Formation et de Recherche des Sciences de la Santé Simone Veil, Montigny-le-Bretonneux, France
7. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 1179, Montigny Le Bretonneux, France.
8. Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, Hôpital Couple-Enfant, Centre Clinique et Biologique d'Assistance Médicale à la Procréation-CECOS, 38700, La Tronche, France
9. GReD, UMR CNRS 6293 INSERM 1103 Université Clermont Auvergne, CRBC, UFR de Médecine et des Professions Paramédicales, 63000, Clermont-Ferrand, France.

The authors declare no potential conflicts of interest.

Corresponding author: Nadia Alfaidy
Unité INSERM U1036. Laboratoire BCI -BIG
CEA Grenoble 17, rue des Martyrs
38054 Grenoble cedex 9
Tel. 04 38 78 35 01
Fax 04 38 78 50 58
nadia.alfaidy-benharouga@cea.fr

ORCID: 0000-0002-0718-2447

Abstract

Fetal growth restriction (FGR), the leading cause of perinatal mortality and morbidity is highly related to abnormal placental development, and placentas from FGR pregnancies are often characterized by increased inflammation. However, the mechanisms of FGR-associated inflammation are far from being understood. NLRP7, a member of a family of receptors involved in the innate immune responses has been shown to be associated with gestational trophoblastic diseases. Here, we characterized the expression and the functional role of NLRP7 in the placenta and investigated its involvement in the pathogenesis of FGR. We used, primary trophoblasts and placental explants that were collected during early pregnancy, established trophoblast-derived cell lines, human placental villi and serum samples from early pregnancy (n=38) and from FGR (n=40) and age-matched controls (n=32). Our results show that NLRP7 ***i)*** is predominantly expressed in the trophoblasts during the hypoxic period of placental development and its expression is up-regulated by hypoxia, ***ii)*** increases trophoblast proliferation ([^{3}H]-thymidine) and controls the precocious differentiation of trophoblasts towards syncytium (syncytin 1 and 2 and β-hCG production and xCELLigence analysis) and towards invasive extravillous trophoblast (2D and 3D cultures). We have also demonstrated that NLRP7 inflammasome activation in trophoblast cells increases IL-1β, but not IL-18 secretion. In relation to the FGR we demonstrated that major components of NLRP7 inflammasome machinery are increased and that IL-1β but not IL-18 circulating levels are increased in FGR. Altogether, our results identified NLRP7 as a critical placental factor and provided evidence for its deregulation in FGR.

Key words: trophoblast invasion, FGR, inflammasome, NLRP7, inflammation, pregnancy

Introduction

Inflammation during pregnancy is a serious clinical problem associated with childhood and adult diseases [1,2]. Fetus exposure to inflammation increases the incidence of stillbirth, and surviving fetuses are at increased risk of FGR and preterm birth [3,4]. FGR, the leading cause of perinatal mortality and morbidity affects approximately 8% of all pregnancies [5,6]. Today, it is well established that FGR occurrence is highly related to abnormal placental development [7-9] and that placentas from FGR pregnancies are characterized by increased inflammation [10], placental apoptosis [11-13], poor invasion of the maternal spiral arterioles [14] or a reduced Syncytiotrophoblast (ST) barrier [15].

Recent data showed that inflammation-induced FGR in pregnant rats was associated with altered placental morphometrics, including reduced placental weight and thickness, as well as decreased placental area [10], and that antenatal suppression of IL-1 protects against inflammation-induced fetal injury and improves neonatal and developmental Outcomes in mice [16]. These finding suggest a potential link between aberrant inflammation and FGR development.

During pregnancy, infection caused by the pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) is a well-known cause of inflammation but, as in many cases of pathological pregnancies, there is no detectable infection while evidence of inflammation [17,18]. Recent studies reported that the damage associated molecular pattern (DAMPs) [19,20], such as uric acid crystals, can induce inflammation through the same receptors as pathogens, namely the Toll-like receptors (TLRs) and NOD-like receptors (NLRs) [19,20]. While TLRs-induced inflammation in FGR pregnancy has been well studied, the NLRs-induced inflammation remains largely unknown.

NLRs are cytoplasmic receptors that play a crucial role in the innate immune response by recognizing the PAMP and DAMPs. Among functions ensured by activated NLRs is the inflammasome formation. The inflammasome is defined as an intracellular multimeric protein complex that contains a sensor receptor (NLR) [21], an adaptor protein called ASC protein [22] and an effector enzyme, the caspase-1. This complex catalyzes a cellular reaction to protect against an immediate danger resulting in the processing and maturation of pro-inflammatory cytokines, the interleukin, (IL-1β) and IL-18 [23]. Eight members of NLRs, named NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRP6, NLRP7, NLRP12, NLRC4, and NAIP, are known to exhibit inflammasome activities. It is to be noted that different members of NLRs can contribute to the intracellular maturation of IL-1β and IL-18 maturation [23]. In relation to pregnancy pathologies, only NLRP3 and NLRP7 were reported to be deregulated [23,24]. NLRP3 increased-inflammasome activity has been reported in preeclampsia and or FGR [25,26]. NLRP7, also known as NALP7, has been studied extensively in relation to gestational trophoblastic diseases, as mutations of its gene have been reported in 50% of complete hydatidiform moles with high risk of evolving to choriocarcinoma [27,28]. Nevertheless, the expression and the role of NLRP7 in human placentation and its potential involvement in the development of main pregnancy pathologies such as preeclampsia and FGR is not known.

Here we have determined the pattern and profile of expression of NLRP7 during the first trimester of human pregnancy and determined its direct role on placental development by demonstrating its effects on trophoblast proliferation, differentiation, migration, invasion and apoptosis. Furthermore, using a distinctive clinically well-

defined cohort of human pregnancies, we determined NLRP7's inflammasome activity in the placental tissues from FGR and uncomplicated gestation age-matched control (AMC) pregnancies.

Materials and methods

Tissue collection

Collection and processing of human placentas were approved by the local hospital ethical committees and informed patient consent was obtained in all cases. All procedures were conducted in accordance with the Helsinki Declaration of 1975. First trimester human placentas (n=38), from 6–14 weeks of gestation (Wg) were obtained from elective terminations of pregnancies from Grenoble Hospital. FGR and AMC placentas were collected between 30 and 39 Wg at the Poissy-Saint Germain Hospital France, and at the Royal Women's Hospital in Melbourne, Australia. Patient characteristics are presented in **Table1.**

Inclusion criteria for all samples in the study were a birth-weight less than the 10th percentile for gestational age using growth charts of the French/Australian population. Preeclampsia is often associated with FGR, however, in this study, we aimed to investigate a population of idiopathic FGR, therefore all patients were normotensive. The following characteristics were excluded in the selection of both control and FGR samples: prolonged rupture of membranes beyond 24 hours and/or evidence of placental abruption; maternal chemical dependency; underlying maternal diseases including, preeclampsia, maternal hypertension, gestational diabetes, type 1 and 2 diabetes; suspicion of intrauterine viral infection; fetal congenital anomalies; chromosomal abnormalities; pregnancies with multiple fetuses; and suspected intrauterine infection.

The gestational age for both FGR and control patients included in this study was calculated based on the last menstrual period and confirmed by second-trimester ultrasound in 90 % of the patients, or solely based on the first-trimester scan in the remaining 10 % of the patients. Control pregnancies were selected to match FGR cases according to gestational age. Control women either presented in spontaneous idiopathic preterm labor or underwent elective delivery. All control placentas obtained were grossly normal and were obtained within 20 minutes of delivery. Placental tissue samples were excised from random areas of the placental cotyledons, but excluded the peripheral margin and infarcted areas. Samples from each placenta were snap frozen and stored at -80°C for RNA and protein analysis or fixed in 4% paraformaldehyde for immunohistochemical analysis.

Blood sample collection

Analysis of circulating cytokines (IL-1β and IL-18) in FGR (n=23) and AMC (n=31) was performed using a bank of sera that were collected at Hospital Poissy-Saint Germain. All patients gave informed consent and the study was approved by the local ethics committee.

IL-1β and IL-18 ELISA

IL-1β and IL-18 were measured by ELISA (PeproTech, France for IL-1β and R&D systems for IL-18) in the collected sera. Only mature cytokines are measured using these kits. Two separated standard curves were constructed to allow accurate readings of samples at upper and lower ranges of the assay. All samples were in the linear range of the standard curves. The detection limit of the assay was 8 pg/ml for IL-1β and 11 pg/ml for IL-18.

Cells and explant cultures (PEX)

***Isolation and purification of villous cytotrophoblasts**:* Villous cytotrophoblasts (VCT) were isolated from first-trimester chorionic villi by differential trypsin digestion according to previous published protocol [29-31]. Briefly, after isolation cells incubated at 37°C under normoxic (20 % O_2) or hypoxic (1.5% O_2) conditions.

***HTR8/SV* neo *culture**:* The human normal extravillous trophoblast cell line, HTR8/SV neo (ATCC® CRL3271™) were used between 24 and 30 passages and grown in RPMI-1640, 10% FBS [32]. Cells were maintained at 37°C under normoxic (20 % O_2) or hypoxic (1.5% O_2) conditions. HTR8/SVneo cells represent extravillous trophoblasts and derive from first-trimester placental tissue collected from a normal pregnancy.

***BeWo cell line**:* The human choriocarcinoma-derived BeWo trophoblast cell line (clone B30) was a kind gift from Prof. Stephen Rogerson (The University of Melbourne). Cells were cultured in RPMI-1640 medium, 10% FBS. The cells were then induced to aggregate and fuse [33]. BeWo is used as surrogate for primary villous trophoblasts since it reveals most of the characteristics of villous trophoblast, and recapitulates syncytial fusion processes.

***Human Placental explant (PEX culture)**:* Villous explant cultures were established from first-trimester human placentas at 7–12 wg as previously reported [32]. Explants were cultured in DMEM Ham's F-12 medium (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). After 24 h of culture, explants were transfected with the SiRNAs. For each placenta, three explants were used for each determination. For statistical analysis, the n value represents the number of placentas, not explants. PEX in culture preserve the topology of intact villi and closely mimic the formation of anchoring villi occurring *in vivo* by the end of the first trimester of pregnancy.

Statistical Analysis

Statistical comparisons were made using the Student's t-test and the one-way ANOVA. All data were checked for normality (Shapiro-Wilk) and equal variance. When normality failed, a nonparametric tests were used. Both Mann-Whitney Rank Sum and Kruskal-Wallis tests were used. All analyses were performed using SigmaStat, Jandel Scientific Software. All data are expressed as means Mean ± SD ($P<0.001$, 0.01 and 0.05).

Results

NLRP7 protein expression in the human placentas during the first trimester of pregnancy.

Human placentas from six to fourteen weeks of gestation (wg) were used to immunolocalize NLRP7 protein. NLRP7 was mainly observed in cytotrophoblast (CT) and ST cells during the first nine weeks of gestation (**Fig. 1A a-d**). A weak immunoreactivity was observed in the Hofbauer cells. To determine whether NLRP7 is expressed in invasive extravillous trophoblasts (EVT) we performed an immunofluorescence using both NLRP7 and HLA-G antibodies. HLA-G is a specific protein marker for invasive EVT. **Fig. 1B** shows that NLRP7 and HLA-G protein do not colocalise (**Fig. 1Ba-e**).

The pattern of NLRP7 protein expression was analyzed on protein extracted from placental tissue homogenates. The specificity of NLRP7 antibody is reported in **Fig. S1A**. Because of the pattern of NLRP7 expression throughout the first trimester of pregnancy, reported on **Fig.1C**, we quantified its expression in relation to the time of the placental oxygenation and the establishment of the feto-maternal circulation, an early gestational period (6-9 wg) and a late gestational period (10-14wg). A significant decrease in NLRP7 protein levels was observed during the late first trimester, **Fig. 1D**.

NLRP7 protein is up-regulated by hypoxia and activated in trophoblast cells.

Low oxygen tension is a key parameter that controls gene expression and placental development during the first trimester of placental development [34,35]. Because NLRP7 expression was significantly higher during this period, we hypothesized that it might be regulated by oxygen tension. To test this hypothesis, we incubated HTR8/SVneo for 48 hours under either 20% or 1.5% O_2. There was a significant increase in NLRP7 protein expression under hypoxia, suggesting that NLRP7 is up-regulated by oxygen tension in trophoblast cells, **Fig. 2A-B**.

Previous studies have reported that NLRP7 could be specifically activated by FSL-1, a bacterial-derived toll-like receptor 2/6 agonist for NLRP7 [36], therefore, we have verified whether HTR8/SVneo can be activated upon their stimulation with FSL-1. **Fig. S2A** and **B** show that FSL-1 increased Il-1β secretion and production in HTR8/SVneo. However, no significant effect was observed on IL-18 production, **Fig. S2C**. Also, we demonstrated that NLRP7 inactivation using siRNA strategy decreased IL-1β and Il-18 mRNA expression, **Fig. S2D** and **E**, respectively.

NLRP7 protein expression correlates with the trophoblast undifferentiated state.

Placental trophoblast proliferation and differentiation towards ST or invasive EVT are important phenomenon for normal placental development. To determine whether NLRP7 affects these processes, we first compared NLRP7 protein levels in primary CT cultures during their differentiation towards ST. The experiment was conducted under normoxic and hypoxic conditions and lasted 90 hours. **Fig. 2C** shows that under normoxic conditions, NLRP7 levels increased up to 48 hours and then decreased significantly at 72 and 92 hours. Under hypoxic conditions, NLRP7 expression was stable for up to 90 hours. Under normoxic conditions, CT cells differentiated into syncytium after 72 to 90 hours, however, under hypoxic conditions, CT differentiated less into syncytium and were more proliferative [34,35]. A quantification of three independent experiments is shown in **Fig. 2D**. These data strongly suggest that NLRP7 protein is associated with an undifferentiated state of trophoblast cells and that this protein might regulate trophoblast cell proliferation and differentiation.

Role of NLRP7 in trophoblast proliferation

Using siRNA strategy, we compared the proliferation rate of HTR8/SVneo using the PrestoBlue assay. **Fig. S3A** and **3B** report the effect of NLRP7 -SiRNA transfection on the levels NLRP7 mRNA and protein. We demonstrate that NLRP7 silencing causes a significant decrease in the proliferative rate of HTR8/SV*neo*, **Fig. 2E**. To confirm these results, we measured [^{3}H]-thymidine incorporation into the HTR8/SVneo after NLRP7 silencing. There was a significant decrease in [^{3}H]-thymidine incorporation in the cells treated with NLRP7 SiRNA compared to Scrambled SiRNA treated cells, **Fig. 2F**, suggesting that NLRP7 protein is directly involved in trophoblast proliferation.

Role of NLRP7 in trophoblast syncytialisation

Both primary trophoblasts and BeWo cells were used to determine the role of NLRP7 in the differentiation of trophoblast cells into ST. **Fig. S3C-F** report the effect of NLRP7 SiRNA on the levels of expression of NLRP7, at the mRNA and protein levels. **Fig. 3A** shows photographs of BeWo cells that were cultured for 92 hours after transfection with NLRP7 SiRNA or Scrambled SiRNA. There was an increase in the number of syncytium units in the NLRP7 siRNA conditions (**Fig. 3B**), suggesting that NLRP7 negatively controls cells differentiation towards syncytium formation. Forskolin, an inducer of trophoblast syncytialisation was used as a positive control. As depicted in **Fig. S4A**, similar to BeWo cell cultures, an increase in the number of syncytial units were observed in primary trophoblast cultures. The effect of NLRP7 inactivation on BeWo cell differentiation to ST formation was determined using immunostaining for desmoplakin. As shown in **Fig. S4B** a qualitative decrease in immunoreactive desmoplakin was observed in NLRP7 siRNA treated cells. Also, we observed a significant increase in β-hCG concentrations in the NLRP7 siRNA treated cells compared with the scrambled siRNA treated cells, confirming the potential role of NLRP7 in the direct or indirect regulation of the process of syncytialisation of trophoblasts, **Fig. 3C**. The differentiation potential of BeWo cells was also further evaluated using the xCELLigence system. As shown in **Fig. 3D**; a significantly increased differentiation potential as measured by the electrical impedance and represented by the cell-index (CI) was observed in NLRP7 siRNA.

We have also further demonstrated that the levels of expression of β-hCG, as well as syncytin-1 (ST1) and syncytin-2 (ST2), the two fusogenic membrane glycoproteins that are critical in the process of syncytialisation, were higher in the NLRP7 siRNA condition. **Fig 3E-G** show that β-hCG and ST1 mRNA, but not ST2 mRNA, were significantly increased in the absence of NLRP7. Altogether these data strongly suggest that NLRP7 negatively controls syncytialisation of the trophoblasts.

NLRP7 influences mRNA and activity of caspases

BeWo cells treated with NLRP7 siRNA or Scrambled siRNA were pooled from n=6 independent experiments. The candidate genes were prioritized based on the fold-change in mRNA in NLRP7 siRNA treated cells compared to scrambled siRNA treated cells. Of the 84 genes in the array plate, caspases 1, 3 and 8 were identified as candidate genes based on their fold-change differences in NLRP7 siRNA, for caspase 1 (29% decrease), 3 (11% decrease) and 8 (9% decrease). Further validation of these candidate caspases by real-time PCR as depicted in **Fig. 4A-C,** as shown a significant decrease in caspase 1 mRNA was observed in NLRP7

SiRNA treated cells compared to Scrambled SiRNA treated cells, however, there was no significant change observed neither for caspases 3 or for caspase 8 mRNA between the NLRP7 SiRNA and Scrambled SiRNA treated cells. These results were further confirmed at the activity levels of caspase 1, 3 and 8, respectively, **Fig 4D-F**.

Effects of NLRP7 on EVT migration and invasion.

NLRP7 effect on HTR8/SVneo migration and invasion

The effect of NLRP7 on the migration of HTR8/SVneo cells was quantitated using the Boyden chamber assay in the NLRP7 siRNA and Scrambled siRNA conditions, **Fig. 5A**. As shown, there was a significant increase in the rate of migration of HTR8/SVneo in the absence of NLRP7, suggesting that the NLRP7 negatively controls trophoblast migration. We then determined the effect of NLRP7 on trophoblast invasion. Using the Transwell invasion assay HTR8/SVneo cell invasion was assessed in the NLRP7 siRNA and scrambled siRNA conditions. As depicted in **Fig. 5B**, a significant increase in the invasion potential of HTR8/SVneo was observed in the absence of NLRP7, suggesting that the NLRP7 protein negatively controls trophoblast invasion.

NLRP7 effect on EVT invasion using the placental explant (PEX) model

We investigated the effects of NLRP7 on EVT outgrowth and invasion in the PEX. Fig. S3G-H depicts the effect of NLRP7 siRNA transfection on the levels of expression of NLRP7 at the mRNA and protein levels. **Fig. 5C** shows representative photomicrographs of placental villous tips at day three of culture in the NLRP7 siRNA and Scrambled siRNA conditions. In the control condition, less outgrowth of EVT was observed from the distal end of the villous tip and migration into the matrigel. However, in the absence of NLRP7, considerable invasion of EVT was observed. The graphical representation illustrated in **Fig. 5D** reports the quantification of EVT migration in six independent experiments at day three of culture of the PEX.

NLRP7 affects the expression of proteins involved in trophoblast invasion

To obtain further insights into the mechanism by which NLRP7 might affect trophoblast invasion, we compared the effect of NLRP7 siRNA on the expression of an array of cytokines expressed by trophoblast cells. **Fig. S4A** shows that NLRP7 inhibition deregulates multiple cytokines. As depicted a significant increase in the expression of Prolactin, IGF-II and VEGFR2, three key proteins directly involved in trophoblast invasion [37-39] was observed in NLRP7 SiRNA compared to Scrambled SiRNA treated cells. **Fig. S4B** reports a graph that confirms the increase of these three genes at the mRNA levels. These data suggest that NLRP7 may control trophoblast invasion through the regulation of key inflammatory cytokines and growth factors.

NLRP7 inflammasome machinery is deregulated in FGR pregnancies

As all the aforementioned experiments conducted in trophoblasts and in PEX demonstrated the involvement of NLRP7 in placental development, we hypothesized that an increase in the expression of NLRP7 will be associated with placental pathologies associated with FGR-affected pregnancies. Therefore, we compared the NLRP7 expression levels and that of its inflammasome machinery in a bank of sera and placental tissues collected from third trimester FGR-affected pregnancies compared to AMC. **Fig. 6A** shows that NLRP7 mRNA was significantly elevated in FGR compared to AMC. NLRP7 increase at the mRNA level was further confirmed at the protein level. NLRP7 was mainly expressed by the syncytium in the control placentas, however, in the FGR placentas, a qualitative increase in the immunoreactivity was observed in the smooth muscle cells

surrounding the fetal blood vessels, **Fig 6B**. The increase in the NLRP7 protein was confirmed by Western blotting, **Fig. 6C-D**. To determine whether the NLRP7 machinery was also affected in the FGR condition, we compared the levels of expression of ASC, caspase1 and the pro- and mature forms of IL-1β.

We demonstrated that ASC protein expression was increased in the FGR placentas, **Fig. 6E-F,** but caspase1 protein levels unchanged, **Fig. 6G-H**. IL-1β analysis showed that both pro- and mature IL-1β forms were expressed in the control placentas, **Fig. 6I**. However, in the FGR placentas, an increase in the levels of the mature form of the IL-1β was observed (**Fig. 6K),** while a significant decrease was observed in the pro- IL-1β **(Fig. 6J)**.

Circulating IL-1β and IL-18 are deregulated in FGR patients.

Here we compared the levels of circulating IL-1β and IL-18 in the sera from FGR and AMC. **Fig 7A** and **7B** show that circulating IL-1β levels were significantly increased in the FGR patients compared to AMC. In contrast, we observed a significant decrease in the levels of circulating IL-18. These findings were further substantiated *in situ* at the placental levels, where trends toward increased levels of IL-1β, **Fig 7C** and decreased levels of IL-18 were observed, **Fig 7D**. These data also strongly suggest that IL-1β and IL-18 are differentially regulated in the FGR compared to AMC. Importantly, data from the literature have previously reported that IL-18 and IL-1β act through distinct cell surface receptors and have distinct consequences during infections [40,41]. In some settings IL-18 can even counteract the *in vivo* effects of IL-1β [40]. Such findings suggest that tailoring the ratio of IL-1β versus IL-18 that is processed by inflammasomes might contribute to the fine-balance in inflammatory responses.

Discussion

The present work demonstrates the direct involvement of NLRP7 in the growth of the placental villi during the first trimester of pregnancy and brings evidence of its aberrant expression and dysregulation in a major placental pathology, the FGR. Despite a growing body of research investigating the function of the inflammasomes in animal models [25,42], there is still limited evidence identifying the components of the inflammasomes in human physiology and disease.

Here, we propose that NLRP7 is one of the key inflammatory proteins that should be ranked among the important factors, which are crucial for the fine control of both physiological and pathological aspects of placental development. These statements are based on three observations. Firstly, we have demonstrated that NLRP7 is mainly expressed during the period in which hypoxia mediated changes in placental development occurs [43]. We have also reported that the strongest expression of NLRP7 was observed in the ST, suggesting a direct control of intracellular inflammatory processes by NLRP7 in a cell type that directly comes in contact with the maternal blood. Our data also demonstrated that NLRP7 inhibits trophoblast migration and invasion, confirming its control of trophoblast differentiation. While the mechanism of this control is still to be demonstrated, we observed that NLRP7 does not colocalise with HLA-G protein and that its inactivation in HTR8/SVneo led to trends in the increase of HLA-G and HLA-C mRNA expression, suggesting a negative regulation of two specific protein of the EVT by NLRP7 (data not shown). Importantly, HLA-C expression has been reported to be increased by NLRP2 protein [44].

Secondly, we have also demonstrated that NLRP7 increases the proliferation of trophoblast cells, with direct control of their differentiation towards the formation of syncytium and/or EVT. An increase in NLRP7 induced trophoblast proliferation is of biological significance as this effect on trophoblast cells is mandatory for the continuous growth of the villi in a hypoxic environment. By increasing the proliferation of anchoring EVT, NLRP7 may participate in the formation of trophoblast plugs that are known to protect the growing villi, as well as the developing embryo from the harmful exposure to high oxygen levels in early gestation. The control of trophoblast differentiation towards syncytium formation or EVT by NLRP7 demonstrates that this factor drives the CT towards a proliferative pathway in preference to a differentiated one. This finding was clearly demonstrated in the PEX model. Furthermore, by using the BeWo cells, we have also demonstrated that NLRP7 is essential for the renewal of CTs to syncytium.

Thirdly, we have demonstrated that NLRP7 inflammasome machinery is dysregulated in idiopathic FGR, suggesting a possible direct regulatory role of NLRP7 in the aetiology of FGR, or as a compensatory mechanism to ensure the progress of the pregnancy. In the case of a compensatory role, this protein may well contribute to the reactivation of the proliferative processes often observed in the trophoblastic and the vascular system [45,29]. Importantly, our data show that in the FGR placenta, NLRP7 protein was strongly expressed in vascular smooth muscle cells (vSMCs) surrounding fetal capillaries. These findings suggest that NLRP7 may also be involved in vascular inflammation that is often associated with the pathogenesis of FGR. Importantly, recent data reported that NLRP3 is involved in several pathological vascular conditions including ischaemia/reperfusion [46]. Hence, one can speculate that the increased levels of NLRP7 expression in the vascular system may contribute to the inflammatory reaction, in response to the recurrent ischaemia/reperfusion phenomenon associated with the pathogenesis of FGR placentas [47]. Data from the literature also reported that vSMCs are highly involved in the

inflammatory reaction through overexpression of receptors affecting inflammation [48,49]. This data suggests that NLRP7 may play a critical role in mediating activation of vSMCs and contributing to FGR pathogenesis.

Speculations on the role of NLRP7 as a compensatory factor in FGR are to be taken with caution since the inflammasome machinery in a given cell is common to multiple types of NLRs proteins. While, we are confident that NLRP7 protein is dysregulated in FGR, the associated changes in the inflammasome machinery might well be due to activation of other inflammasome member, including activation of NLRP3, as this protein has recently been reported to be involved in the pathogenesis of FGR in the pregnant rats [25]. Another explanation for the enhanced expression of NLRP7 inflammasome in the FGR placentas could be drawn in respect to the control of EVT invasion by this protein. A sustained activity of the NLRP7 inflammasome over the first trimester of pregnancy in response to external stimuli such as hypoxia, DAMP and PAMP might compromise the remodelling of the spiral arterioles, a defect that is known to be a major cause of utero-placental hypoxia and a central event in most placental pathologies associated with FGR [14,10,9].

To date, we do not have a direct demonstration of these hypotheses, as only a clinical prospective study examining the NLRP7 inflammasome activity during the first trimester of pregnancy in women who go on to develop FGR will determine whether elevated expression of this factor in FGR pregnancies is a cause or a consequence of the pathology.

Acknowledgements

We acknowledge the following sources of funding's: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (U1036), University Grenoble-Alpes, Commissariat à l'Energie Atomique (DSV/iRTSV/BCI), Région Auvergne-Rhône-Alpes "CLARA", Ligue Nationale contre le Cancer and Ligue Départementale (Isère) and Fondation pour la recherche Médicale (FRM) SPF20150934074. We also thank Ms Sophie Ndagijimana for her technical assistance.

Reference list

1. Mwaniki MK, Atieno M, Lawn JE, Newton CR (2012) Long-term neurodevelopmental outcomes after intrauterine and neonatal insults: a systematic review. Lancet 379 (9814):445-452. doi:10.1016/S0140-6736(11)61577-8
2. van Vliet EO, de Kieviet JF, van der Voorn JP, Been JV, Oosterlaan J, van Elburg RM (2012) Placental pathology and long-term neurodevelopment of very preterm infants. American journal of obstetrics and gynecology 206 (6):489 e481-487. doi:10.1016/j.ajog.2012.03.024
3. Derricott H, Jones RL, Greenwood SL, Batra G, Evans MJ, Heazell AE (2016) Characterizing Villitis of Unknown Etiology and Inflammation in Stillbirth. The American journal of pathology 186 (4):952-961. doi:10.1016/j.ajpath.2015.12.010
4. Eichenwald EC, Stark AR (2008) Management and outcomes of very low birth weight. The New England journal of medicine 358 (16):1700-1711. doi:10.1056/NEJMra0707601
5. Baschat AA (2004) Fetal responses to placental insufficiency: an update. BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology 111 (10):1031-1041. doi:10.1111/j.1471-0528.2004.00273.x
6. Pollack RN, Divon MY (1992) Intrauterine growth retardation: definition, classification, and etiology. Clinical obstetrics and gynecology 35 (1):99-107
7. Krebs C, Macara LM, Leiser R, Bowman AW, Greer IA, Kingdom JC (1996) Intrauterine growth restriction with absent end-diastolic flow velocity in the umbilical artery is associated with maldevelopment of the placental terminal villous tree. American journal of obstetrics and gynecology 175 (6):1534-1542
8. Regnault TR, Galan HL, Parker TA, Anthony RV (2002) Placental development in normal and compromised pregnancies-- a review. Placenta 23 Suppl A:S119-129. doi:10.1053/plac.2002.0792
9. Sibley CP, Turner MA, Cetin I, Ayuk P, Boyd CA, D'Souza SW, Glazier JD, Greenwood SL, Jansson T, Powell T (2005) Placental phenotypes of intrauterine growth. Pediatric research 58 (5):827-832. doi:10.1203/01.PDR.0000181381.82856.23
10. Cotechini T, Komisarenko M, Sperou A, Macdonald-Goodfellow S, Adams MA, Graham CH (2014) Inflammation in rat pregnancy inhibits spiral artery remodeling leading to fetal growth restriction and features of preeclampsia. The Journal of experimental medicine 211 (1):165-179. doi:10.1084/jem.20130295
11. Ishihara N, Matsuo H, Murakoshi H, Laoag-Fernandez JB, Samoto T, Maruo T (2002) Increased apoptosis in the syncytiotrophoblast in human term placentas complicated by either preeclampsia or intrauterine growth retardation. American journal of obstetrics and gynecology 186 (1):158-166
12. Levy R, Nelson DM (2000) To be, or not to be, that is the question. Apoptosis in human trophoblast. Placenta 21 (1):1-13. doi:10.1053/plac.1999.0450
13. Smith SC, Baker PN, Symonds EM (1997) Increased placental apoptosis in intrauterine growth restriction. American journal of obstetrics and gynecology 177 (6):1395-1401
14. Arroyo JA, Winn VD (2008) Vasculogenesis and angiogenesis in the IUGR placenta. Seminars in perinatology 32 (3):172-177. doi:10.1053/j.semperi.2008.02.006
15. Mayhew TM, Ohadike C, Baker PN, Crocker IP, Mitchell C, Ong SS (2003) Stereological investigation of placental morphology in pregnancies complicated by pre-eclampsia with and without intrauterine growth restriction. Placenta 24 (2-3):219-226
16. Nadeau-Vallee M, Chin PY, Belarbi L, Brien ME, Pundir S, Berryer MH, Beaudry-Richard A, Madaan A, Sharkey DJ, Lupien-Meilleur A, Hou X, Quiniou C, Beaulac A, Boufaied I, Boudreault A, Carbonaro A, Doan ND, Joyal JS, Lubell WD, Olson DM, Robertson SA, Girard S, Chemtob S (2017) Antenatal Suppression of IL-1 Protects against Inflammation-Induced Fetal Injury and Improves Neonatal and Developmental Outcomes in Mice. Journal of immunology 198 (5):2047-2062. doi:10.4049/jimmunol.1601600
17. Hagberg H, Gressens P, Mallard C (2012) Inflammation during fetal and neonatal life: implications for neurologic and neuropsychiatric disease in children and adults. Annals of neurology 71 (4):444-457. doi:10.1002/ana.22620
18. Saji F, Samejima Y, Kamiura S, Sawai K, Shimoya K, Kimura T (2000) Cytokine production in chorioamnionitis. Journal of reproductive immunology 47 (2):185-196
19. Bianchi ME (2007) DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. Journal of leukocyte biology 81 (1):1-5. doi:10.1189/jlb.0306164
20. Chen GY, Nunez G (2010) Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. Nature reviews Immunology 10 (12):826-837. doi:10.1038/nri2873
21. Kim YK, Shin JS, Nahm MH (2016) NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases. Yonsei medical journal 57 (1):5-14. doi:10.3349/ymj.2016.57.1.5
22. Kufer TA, Sansonetti PJ (2011) NLR functions beyond pathogen recognition. Nature immunology 12 (2):121-128. doi:10.1038/ni.1985
23. Davis BK, Wen H, Ting JP (2011) The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. Annual review of immunology 29:707-735. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101405

24. Zhong Y, Kinio A, Saleh M (2013) Functions of NOD-Like Receptors in Human Diseases. Frontiers in immunology 4:333. doi:10.3389/fimmu.2013.00333
25. Brien ME, Duval C, Palacios J, Boufaied I, Hudon-Thibeault AA, Nadeau-Vallee M, Vaillancourt C, Sibley CP, Abrahams VM, Jones RL, Girard S (2017) Uric Acid Crystals Induce Placental Inflammation and Alter Trophoblast Function via an IL-1-Dependent Pathway: Implications for Fetal Growth Restriction. Journal of immunology 198 (1):443-451. doi:10.4049/jimmunol.1601179
26. Xie F, Hu Y, Turvey SE, Magee LA, Brunham RM, Choi KC, Krajden M, Leung PC, Money DM, Patrick DM, Thomas E, von Dadelszen P (2010) Toll-like receptors 2 and 4 and the cryopyrin inflammasome in normal pregnancy and pre-eclampsia. BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology 117 (1):99-108. doi:10.1111/j.1471-0528.2009.02428.x
27. Nguyen NM, Zhang L, Reddy R, Dery C, Arseneau J, Cheung A, Surti U, Hoffner L, Seoud M, Zaatari G, Bagga R, Srinivasan R, Coullin P, Ao A, Slim R (2014) Comprehensive genotype-phenotype correlations between NLRP7 mutations and the balance between embryonic tissue differentiation and trophoblastic proliferation. Journal of medical genetics 51 (9):623-634. doi:10.1136/jmedgenet-2014-102546
28. Sills ES, Obregon-Tito AJ, Gao H, McWilliams TK, Gordon AT, Adams CA, Slim R (2017) Pathogenic variant in NLRP7 (19q13.42) associated with recurrent gestational trophoblastic disease: Data from early embryo development observed during in vitro fertilization. Clinical and experimental reproductive medicine 44 (1):40-46. doi:10.5653/cerm.2017.44.1.40
29. Brouillet S, Murthi P, Hoffmann P, Salomon A, Sergent F, De Mazancourt P, Dakouane-Giudicelli M, Dieudonne MN, Rozenberg P, Vaiman D, Barbaux S, Benharouga M, Feige JJ, Alfaidy N (2013) EG-VEGF controls placental growth and survival in normal and pathological pregnancies: case of fetal growth restriction (FGR). Cell Mol Life Sci 70 (3):511-525. doi:10.1007/s00018-012-1141-z
30. Hoffmann P, Feige JJ, Alfaidy N (2006) Expression and oxygen regulation of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 and its receptors in human placenta during early pregnancy. Endocrinology 147 (4):1675-1684. doi:10.1210/en.2005-0912
31. Traboulsi W, Sergent F, Boufettal H, Brouillet S, Slim R, Hoffmann P, Benlahfid M, Zhou QY, Balboni G, Onnis V, Bolze PA, Salomon A, Sauthier P, Mallet F, Aboussaouira T, Feige JJ, Benharouga M, Alfaidy N (2017) Antagonism of EG-VEGF Receptors as Targeted Therapy for Choriocarcinoma Progression In Vitro and In Vivo. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 23 (22):7130-7140. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-0811
32. Hoffmann P, Saoudi Y, Benharouga M, Graham CH, Schaal JP, Mazouni C, Feige JJ, Alfaidy N (2009) Role of EG-VEGF in human placentation: Physiological and pathological implications. J Cell Mol Med 13 (8B):2224-2235. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00554.x
33. Murthi P, Brouillet S, Pratt A, Borg A, Kalionis B, Goffin F, Tsatsaris V, Munaut C, Feige J, Benharouga M, Fournier T, Alfaidy N (2015) An EG-VEGF-dependent decrease in homeobox gene NKX3.1 contributes to cytotrophoblast dysfunction: a possible mechanism in human fetal growth restriction. Molecular medicine. doi:10.2119/molmed.2015.00071
34. Burton GJ, Jaunaiux E (2001) Maternal vascularisation of the human placenta: does the embryo develop in a hypoxic environment? Gynecologie, obstetrique & fertilite 29 (7-8):503-508
35. Huppertz B, Gauster M, Orendi K, Konig J, Moser G (2009) Oxygen as modulator of trophoblast invasion. Journal of anatomy 215 (1):14-20. doi:10.1111/j.1469-7580.2008.01036.x
36. Khare S, Dorfleutner A, Bryan NB, Yun C, Radian AD, de Almeida L, Rojanasakul Y, Stehlik C (2012) An NLRP7-containing inflammasome mediates recognition of microbial lipopeptides in human macrophages. Immunity 36 (3):464-476. doi:10.1016/j.immuni.2012.02.001
37. Nandi P, Siddiqui MF, Lala PK (2016) Restraint of Trophoblast Invasion of the Uterus by Decorin: Role in Pre-eclampsia. American journal of reproductive immunology 75 (3):351-360. doi:10.1111/aji.12449
38. Pollheimer J, Haslinger P, Fock V, Prast J, Saleh L, Biadasiewicz K, Jetne-Edelmann R, Haraldsen G, Haider S, Hirtenlehner-Ferber K, Knofler M (2011) Endostatin suppresses IGF-II-mediated signaling and invasion of human extravillous trophoblasts. Endocrinology 152 (11):4431-4442. doi:10.1210/en.2011-1196
39. Stefanoska I, Jovanovic Krivokuca M, Vasilijic S, Cujic D, Vicovac L (2013) Prolactin stimulates cell migration and invasion by human trophoblast in vitro. Placenta 34 (9):775-783. doi:10.1016/j.placenta.2013.06.305
40. Ceballos-Olvera I, Sahoo M, Miller MA, Del Barrio L, Re F (2011) Inflammasome-dependent pyroptosis and IL-18 protect against Burkholderia pseudomallei lung infection while IL-1beta is deleterious. PLoS pathogens 7 (12):e1002452. doi:10.1371/journal.ppat.1002452
41. Dinarello CA (2009) Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. Annual review of immunology 27:519-550. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132612
42. Sun X, Song X, Zhang L, Sun J, Wei X, Meng L, An J (2016) NLRP2 is highly expressed in a mouse model of ischemic stroke. Biochemical and biophysical research communications 479 (4):656-662. doi:10.1016/j.bbrc.2016.09.157

43. Burton GJ (2009) Oxygen, the Janus gas; its effects on human placental development and function. Journal of anatomy 215 (1):27-35. doi:10.1111/j.1469-7580.2008.00978.x
44. Tilburgs T, Meissner TB, Ferreira LMR, Mulder A, Musunuru K, Ye J, Strominger JL (2017) NLRP2 is a suppressor of NF-kB signaling and HLA-C expression in human trophoblastsdagger,double dagger. Biology of reproduction 96 (4):831-842. doi:10.1093/biolre/iox009
45. Brouillet S, Hoffmann P, Feige JJ, Alfaidy N (2012) EG-VEGF: a key endocrine factor in placental development. Trends Endocrinol Metab 23 (10):501-508. doi:10.1016/j.tem.2012.05.006
46. Guo Z, Yu S, Chen X, Ye R, Zhu W, Liu X (2016) NLRP3 Is Involved in Ischemia/Reperfusion Injury. CNS & neurological disorders drug targets 15 (6):699-712
47. Thaete LG, Qu XW, Jilling T, Crawford SE, Fitchev P, Hirsch E, Khan S, Neerhof MG (2013) Impact of toll-like receptor 4 deficiency on the response to uterine ischemia/reperfusion in mice. Reproduction 145 (5):517-526. doi:10.1530/REP-12-0433
48. Davis-Dusenbery BN, Wu C, Hata A (2011) Micromanaging vascular smooth muscle cell differentiation and phenotypic modulation. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 31 (11):2370-2377. doi:10.1161/ATVBAHA.111.226670
49. Sun HJ, Ren XS, Xiong XQ, Chen YZ, Zhao MX, Wang JJ, Zhou YB, Han Y, Chen Q, Li YH, Kang YM, Zhu GQ (2017) NLRP3 inflammasome activation contributes to VSMC phenotypic transformation and proliferation in hypertension. Cell death & disease 8 (10):e3074. doi:10.1038/cddis.2017.470

Table 1: Clinical Characteristics of samples included in the study

Characteristics	FGR (n= 40)	Control (n= 32)	Significance
Gestational age (mean ± SD)	35.3 ± 3.1	34.5 ± 3.4	*p*=0.126
Maternal age (mean ± SD)	31.9 ± 5.7	32.12 ± 5.5	*p*=0.890
Placental weight (g)	382.9 ± 107.9	502.6 ± 156	*p*=0.002**
Birth weight (mean ± SD)	1986.4 ± 593.3	2486.9 ± 787.9	*p*=0.004**

Table 2: Primers used for the RT-qPCR

Gene	Forward primer (5'–3')	Reverse primer (5'–3')	Temperature (°C)
NLRP7	TGCTGTACAAGACCATGACACG	ACTCAAGCCCTCACACAGAAAC	60
ST1	CGGACATCCAAAGTGATACATCT	TGATGTATCCAAGACTCCACTCCA	60
ST2	GCCTGCAAATAGTCTTCTTT	ATAGGGGCTATTCCCATTAG	60
18S	AAACGGCTACCACATCCAAG	CCTCCAATGGATCCTCGTTA	60
IL 1b	GTCGGAGATTCGTAGCTGGAT	GTCGGAGATTCGTAGCTGGAT	60
IL 18	TGCCAACTCTGGCTGCTAAA	TTGTTGCGAGAGGAAGCGAT	60
ASC	TGGATGCTCTGTACGGGAAG	TGGATGCTCTGTACGGGAAG	60
caspase 1	TGCCTGTTCCTGTGATGTGG	TGTCCTGGGAAGAGGTAGAAACATC	60
β hCG	GCTACTGCCCCACCATGACC	ATGGACTCGAAGCGCACATC	60

Figure legends

Figure 1. NLRP7 protein expression in the human placenta during the first trimester of pregnancy. Panel A reports representative photographs of chorionic villi collected at 6 (a), 8 (b), 12 (c), 14 (d) weeks of gestation (Wg) and immunostained with anti-NLRP7 antibody (brown staining). Negative controls are illustrated in (e-f). **Panel B** reports immunofluorescence of human placenta at 7 wg using anti-NLRP7 and anti-HLAG antibodies (a-e). **Panel C** reports a representative Western blot analysis that compares NLRP7 expression in placenta collected during the early (6-9 Wg) and late first trimester of pregnancy (10-14 Wg). **Panel D** reports the quantification of the intensity of the NLRP7 bands in three independent experiments (*p<0.05 versus control). Standardization of the protein signals was performed using β-actin. Cytotrophoblast (Ct), Hofbauer cells (Hb), Syncytiotrophoblast (St), Blood vessels (Bv), proximal trophoblast cells (PTC), distal trophoblast cells (dTC) Scale bar=50µm.

Figure 2: NLRP7 is regulated by hypoxia and controls trophoblast proliferation. Panel A reports a representative Western blot analysis that compares NLRP7expression in HTR-8/SVneo cells upon their culture for 48h, under normoxic or hypoxic conditions. **Panel B** reports the quantification of the intensity of the NLRP7 signal under normoxia or hypoxia (n=7 independent experiments). **Panel C** reports a representative Western blot analysis that compares NLRP7 expression in primary CT cells upon their culture under normoxic or hypoxic conditions up to 92h. Standardization of the protein signals was done using β-actin. Panel D reports quantification of three independent experiments of primary CT upon their culture under normoxic or hypoxic conditions up to 92h**. Panel E** reports a histogram that illustrates the comparison of the HTR-8/SVneo cell's proliferation in the absence (NLRP7 siRNA) or the presence of NLRP7 (Scrambled siRNA) using two different technics, the prestoBlue (**E**) and the ^{3}H thymidine incorporation (**F**). Data represent the mean ± SD of triplicates *p<0.05, ** P< 0.01.

Figure 3: NLRP7 effects on trophoblast differentiation towards syncytium formation. Panel A reports representative photographs of normal (Scrambled siRNA) or invalidated BeWo cells for NLRP7 expression (NLRP7 siRNA), or BeWo cells treated with forskolin (10µM). Cells were cultured for 92h to allow syncytium formation. Scale bar= 50 µm. Circled area indicate syncytium formations. **Panel B** reports the quantification of three independents experiments**. Panel C** compares the levels of β-hCG protein secretion in BeWo in Scrambled siRNA vs NLRP7 siRNA (n=3). **Panel D** illustrates the degree of trophoblasts differentiation (n=3). **Panel E** reports comparisons of β-hCG, Syncytin1, Syncytin2 and mRNA expression between Scrambled siRNA and NLRP7 siRNA in BeWo cells (n=6). Data are mean ± SD. * P< 0.05, ** P< 0.01, ns: not significant.

Figure 4: NLRP7 effects on caspases 1, 3 and 8 mRNA expression and their activity in BeWo cells. Panels A-C report caspase 1, 3 and 8 mRNA levels in Si Scrambled and NLRP7 siRNA BeWo treated cells, respectively. **Panels D-F** compare caspase 1, 3 and 8 activity in Si Scrambled and NLRP7 siRNA BeWo treated cells, respectively (n=4). Data represent the mean ± SD. *** P< 0.001, ns: not significant.

Figure 5: NLRP7 controls extravillous trophoblast migration and invasion. Panel A reports comparison of HTR-8/SVneo migration in Scrambled siRNA and NLRP7 siRNA conditions (n = 6). Cell migration was assessed using the Boyden chamber system**. Panel B** reports comparison of HTR-8/SVneo invasion in

Scrambled siRNA and NLRP7 siRNA conditions (n= 6). **Panel C** reports representative photographs of NLRP7 effect on extravillous trophoblast (EVT) invasion using a 3D culture system, the placental explant system.

Photograph in **b** shows increased budding and outgrowth of EVT from the distal end of the villous tips in the NLRP7 siRNA condition at day 3 of culture. **Panel D** shows quantification of EVT outgrowths per villous tip in the absence or presence of NLRP7 in six independent experiments performed in triplicate. Data represent the mean ± SD, ** P< 0.01.

Figure 6: Components of the NLRP7 inflammasome machinery are deregulated in FGR placentas. Panel A compares NLRP7 mRNA levels in FGR and CTL placentas (n=32 CTL and n=40 FGR). **p <0.01. **Panel B** reports representative photographs of placental sections collected from CTL (a) and FGR (b) patients and immunostained with an anti-NLRP7 antibody (brown color). Photograph in (c) represents a negative control. **Panel C** reports representative Western-blot analysis that compares the expression of NLRP7 in CTL versus FGR placentas. **Panel D** reports the quantification of the intensity of the bands of NLRP7 (**p<0.01). **Panels E, G, and I** report representative Western blot analyses that compares ASC, caspase-1 and IL-1β protein levels in CTL and FGR placentas. **Panels F, H, J and K** report quantification of the blots in **E-I**, respectively. β-actin was used as a loading control. **p<0.01, ns = not significant. Scale bar: 50 µm. **IVS**: Intervillous Space, **Bv**: blood vessel, **MC**: muscle cell. Data represent the mean ± SD.

Figure 7: IL-1β and IL-18 circulating and local levels are deregulated in CTL and FGR patients. Panels A-B report comparisons of the levels of IL-1β and IL-18 in sera collected from CTL n=31, and FGR patients, n=23 serum samples. Circulating IL-1β and IL-18 content were measured by ELISA. Data are represented as Box plot. *P < 0.05, **P < 0.01. **Panels C-D** report comparisons of the levels of IL-1β and IL-18 per mg of protein extracted from placental homogenates of CTL n=8, and FGR patients, n=8 samples. ns = not significant. Data represent the mean ± SD.

Supplementary figures

Figure S1: Panel A reports the specificity of the NLRP7 antibody. The blot in (**a**) shows the 100 KDa band corresponding the NLRP7 protein in HTR-8/SVneo cells. The blot in (**b**) shows that the band corresponding to 100 KDa disappeared in the presence of the antigenic peptide used at 20 times the concentration of NLRP7 antibody used in all experiments.

Figure S2: Effects of NLRP7 activation or silencing on IL-1β and IL-18 expression and secretion in HTR-8/SVneo. Panels A-B reports the effects of NLRP7 activation using FSL1 on the secretion and production of IL-1β**. Panel B reports the effects of NLRP7 activation using FSL1 on the secretion of** IL-18. **Panel D and E** report mRNA expression of IL1-B and IL-18 upon NLRP7 inactivation in HTR-8/SVneo cells (n=6). Data represent the mean ± SD. (**P < 0.01).

Figure S3: Validation of siRNA strategy in HTR-8/SVneo, BeWo, primary cultures and placental explants: Panel A-B report the effects NLRP7 siRNA transfection in HTR-8/SVneo cells on the expression of NLRP7 mRNA and protein, respectively. **Panel C-D** report the effects NLRP7 siRNA transfection in BeWo

cells on the expression of NLRP7 mRNA and protein, respectively. **Panel E-F** report the effects NLRP7 siRNA transfection in primary trophoblast culture on the expression of NLRP7 mRNA and protein, respectively.

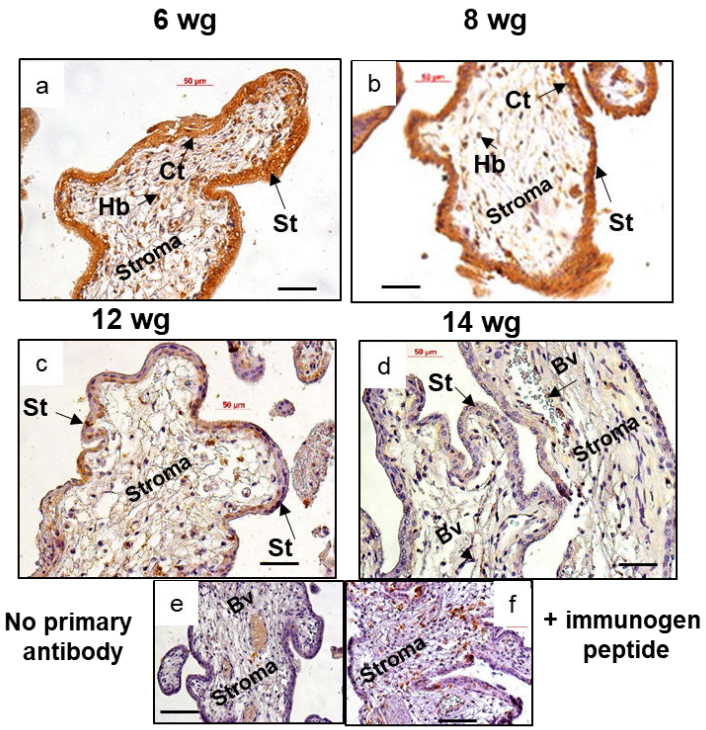
Panel G-H report the effects NLRP7 siRNA transfection in placental explants on the expression of NLRP7 mRNA and protein, respectively. Data represent the mean ± SD. All experiments were performed at least three times.

Figure S4: Panel A. reports primary trophoblast syncytialisation in Scrambled siRNA (a) and NLRP7 siRNA (b) conditions. **Panel B** reports a comparison of syncytialisation of BeWo cells in Scrambled siRNA (a) and NLRP7 siRNA (b) using the desmoplakin immuno-staining.

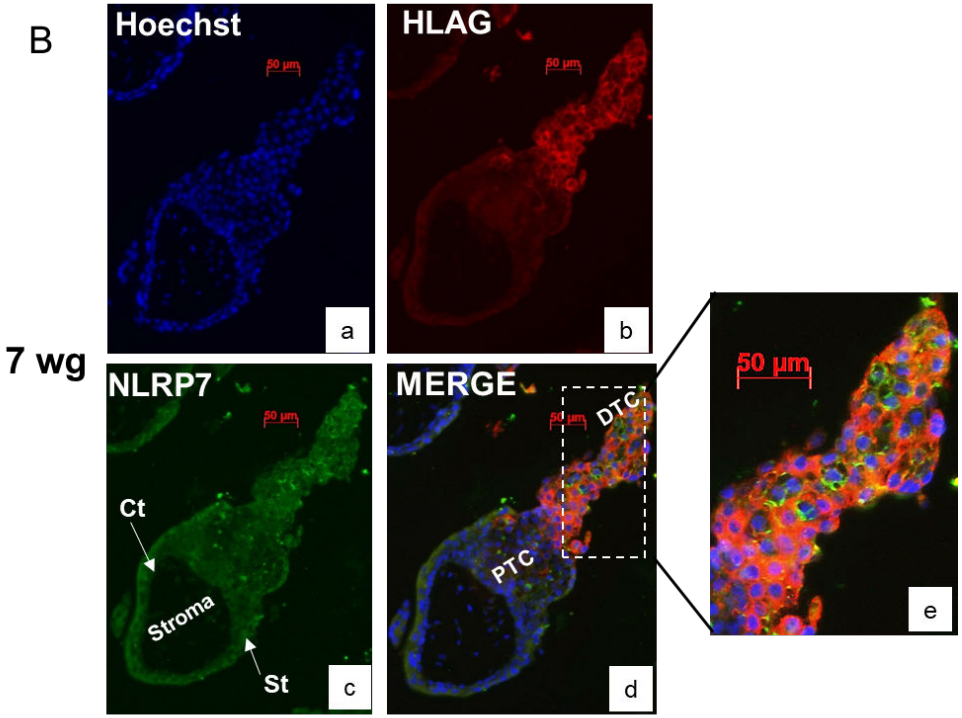
Figure S5: Cytokine array comparison of conditioned media collected from Scrambled siRNA and NLRP7 siRNA. Panel A reports a graph of global analysis of 54 cytokines assessed in Scrambled siRNA and NLRP7 siRNA treated BeWo cells. Blue arrows indicate the cytokine that have been significantly deregulated upon NLRP7 inhibition and are associated with trophoblast invasion. **Panel B** reports the validation of the IGF-II, VEGF-R2 and prolactin at the mRNA levels using RT-qPCR (n=3). Data represent the mean ± SD.

Figure 1

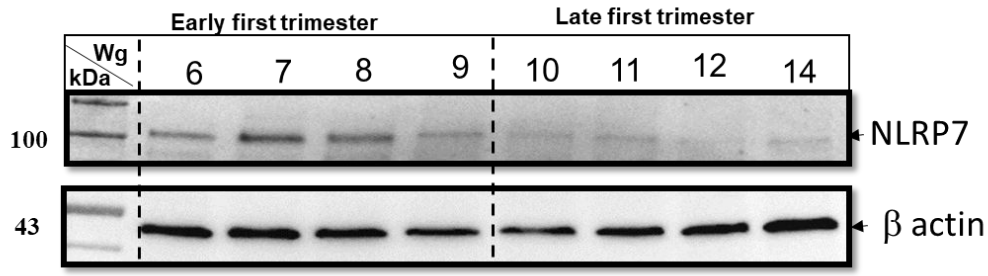
A



B



C



D

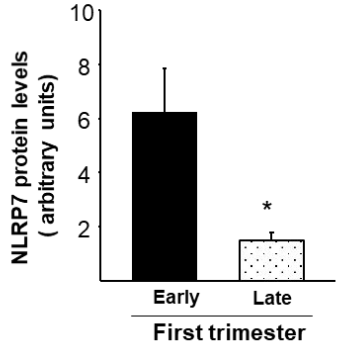


Figure 2

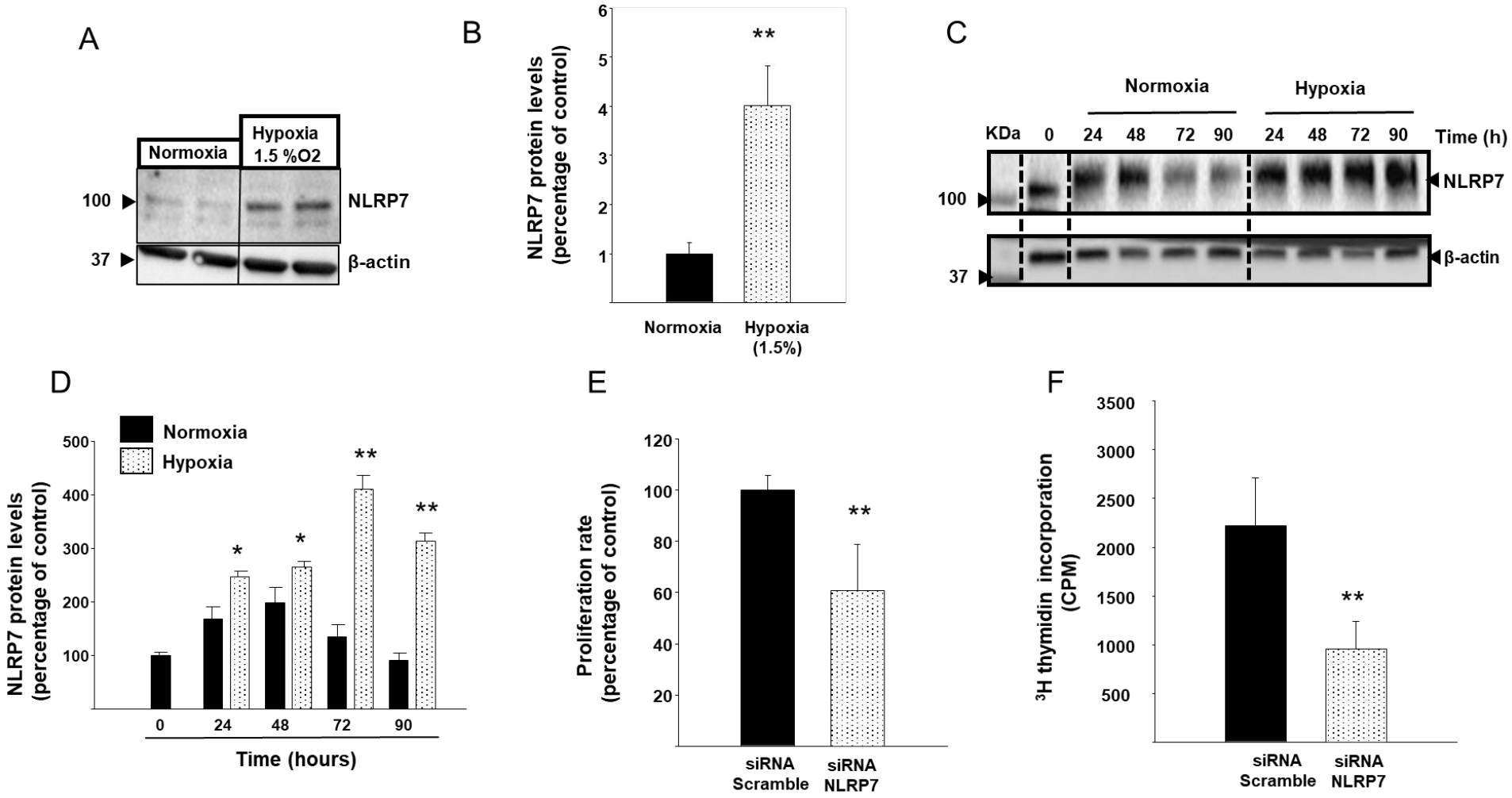

A
Normoxia
Hypoxia
1.5 %O2
100
37
NLRP7
β-actin
B
NLRP7 protein levels
(percentage of control)
**
Normoxia
Hypoxia
(1.5%)
C
Normoxia
Hypoxia
KDa
0
24
48
72
90
24
48
72
90
Time (h)
100
37
NLRP7
β-actin
D
Normoxia
Hypoxia
NLRP7 protein levels
(percentage of control)
*
*
**
**
0
24
48
72
90
Time (hours)
E
Proliferation rate
(percentage of control)
**
siRNA
Scramble
siRNA
NLRP7
F
3H thymidin incorporation
(CPM)
**
siRNA
Scramble
siRNA
NLRP7

Figure 3

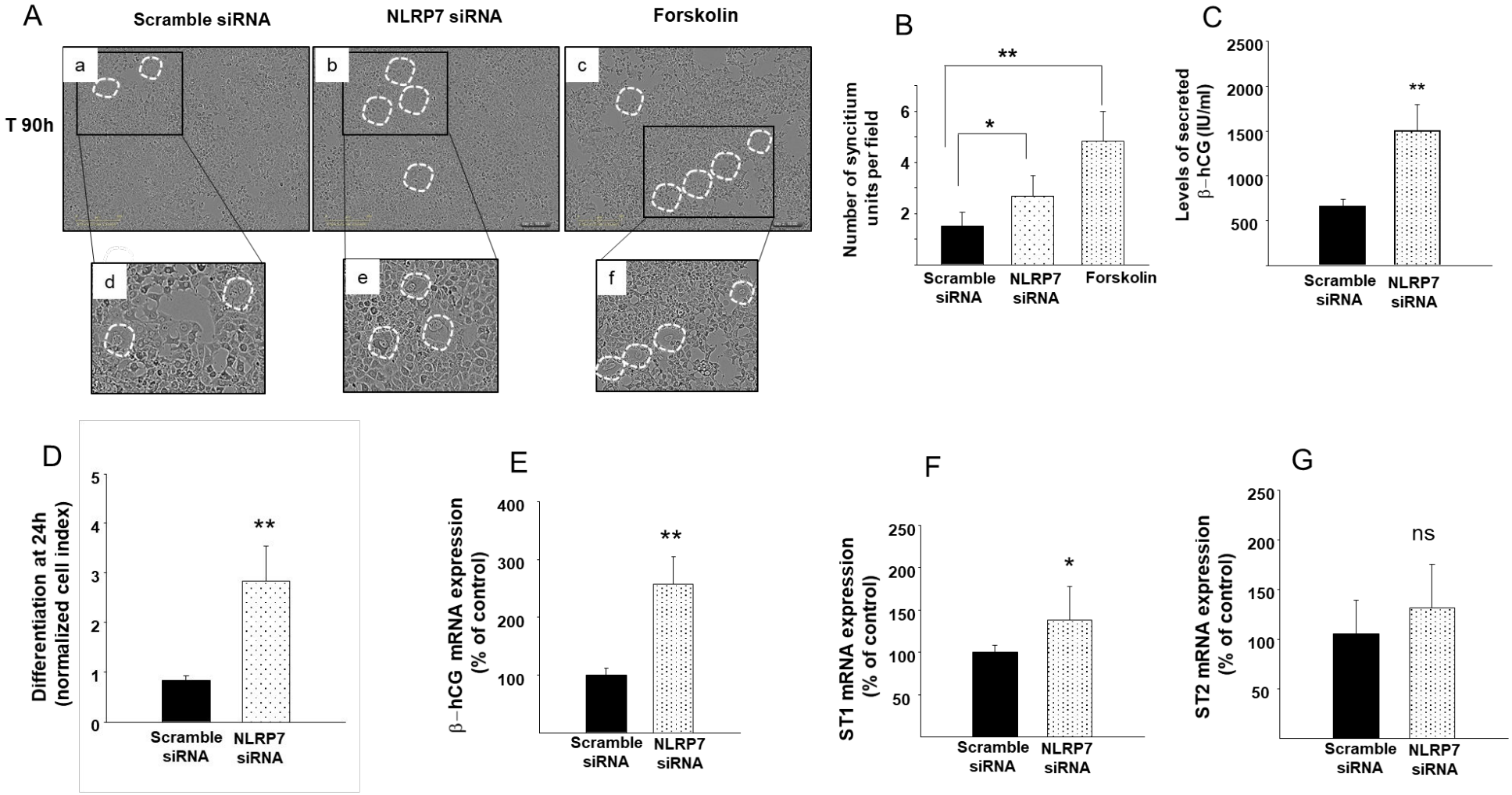

A
Scramble siRNA
NLRP7 siRNA
Forskolin
T 90h
a
b
c
d
e
f
B
Number of syncitium units per field
**
*
Scramble siRNA
NLRP7 siRNA
Forskolin
C
Levels of secreted β−hCG (IU/ml)
**
Scramble siRNA
NLRP7 siRNA
D
Differentiation at 24h (normalized cell index)
**
Scramble siRNA
NLRP7 siRNA
E
β−hCG mRNA expression (% of control)
**
Scramble siRNA
NLRP7 siRNA
F
ST1 mRNA expression (% of control)
*
Scramble siRNA
NLRP7 siRNA
G
ST2 mRNA expression (% of control)
ns
Scramble siRNA
NLRP7 siRNA

Figure 4

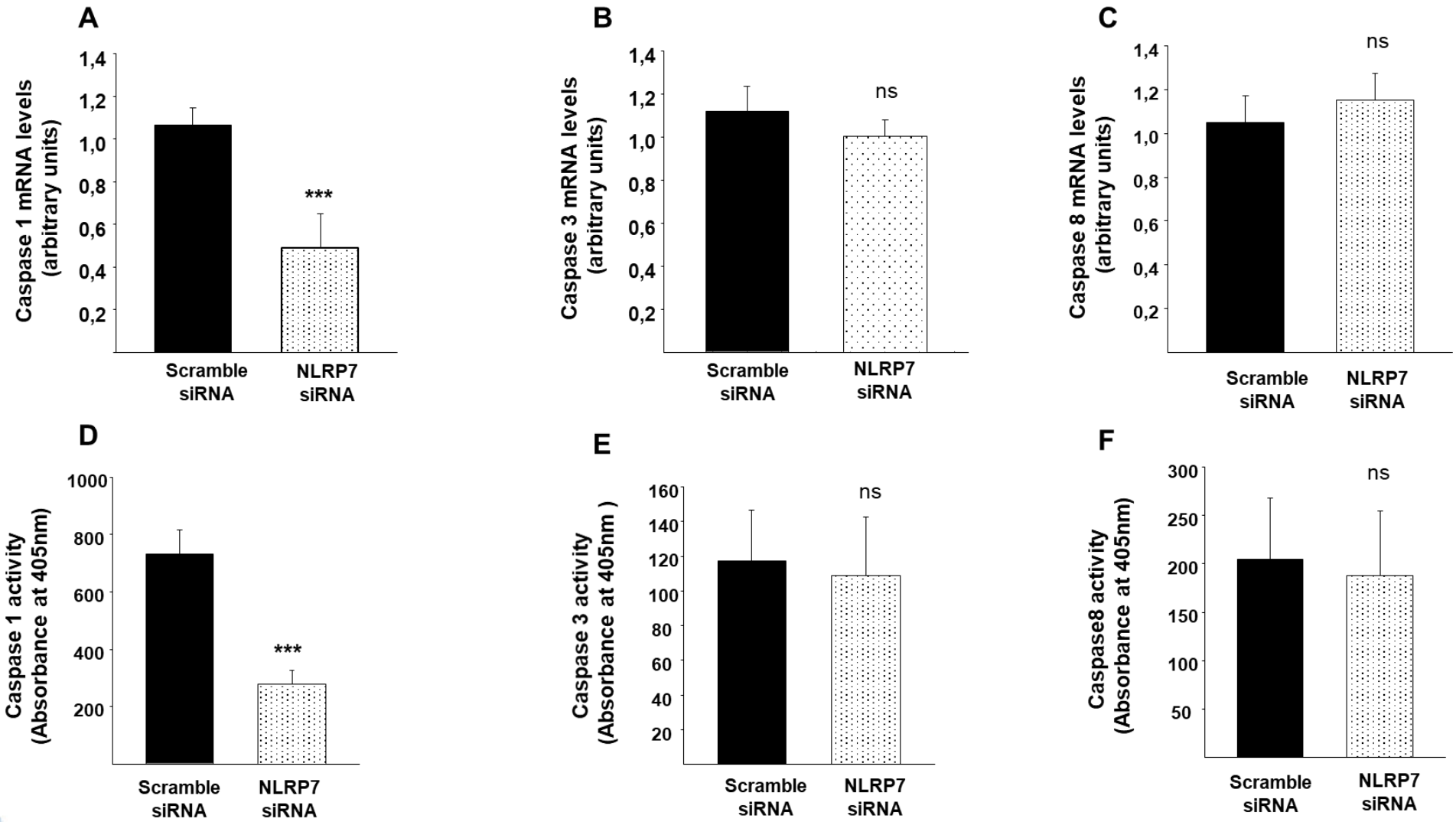

A
Caspase 1 mRNA levels (arbitrary units)
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
***
Scramble siRNA
NLRP7 siRNA
B
Caspase 3 mRNA levels (arbitrary units)
ns
C
Caspase 8 mRNA levels (arbitrary units)
D
Caspase 1 activity (Absorbance at 405nm)
1000
800
600
400
200
E
Caspase 3 activity (Absorbance at 405nm)
160
140
120
100
80
60
40
20
F
Caspase8 activity (Absorbance at 405nm)
300
250
200
150
100
50

Figure 5

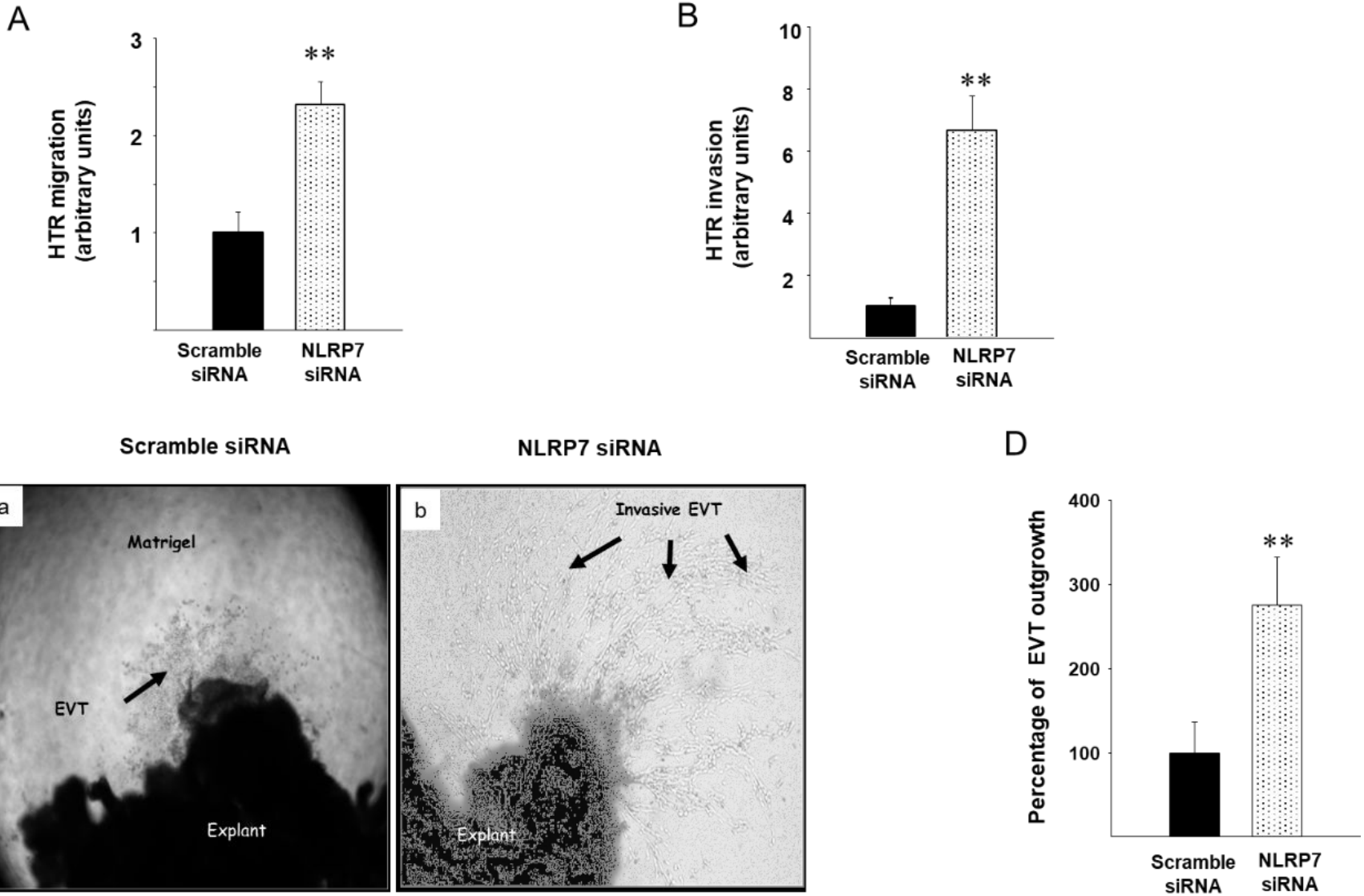

A
HTR migration (arbitrary units)
3
2
1
**
Scramble siRNA
NLRP7 siRNA
B
HTR invasion (arbitrary units)
10
8
6
4
2
**
Scramble siRNA
NLRP7 siRNA
C
Scramble siRNA
NLRP7 siRNA
a
Matrigel
EVT
Explant
b
Invasive EVT
Explant
D
Percentage of EVT outgrowth
400
300
200
100
**
Scramble siRNA
NLRP7 siRNA

Figure 6

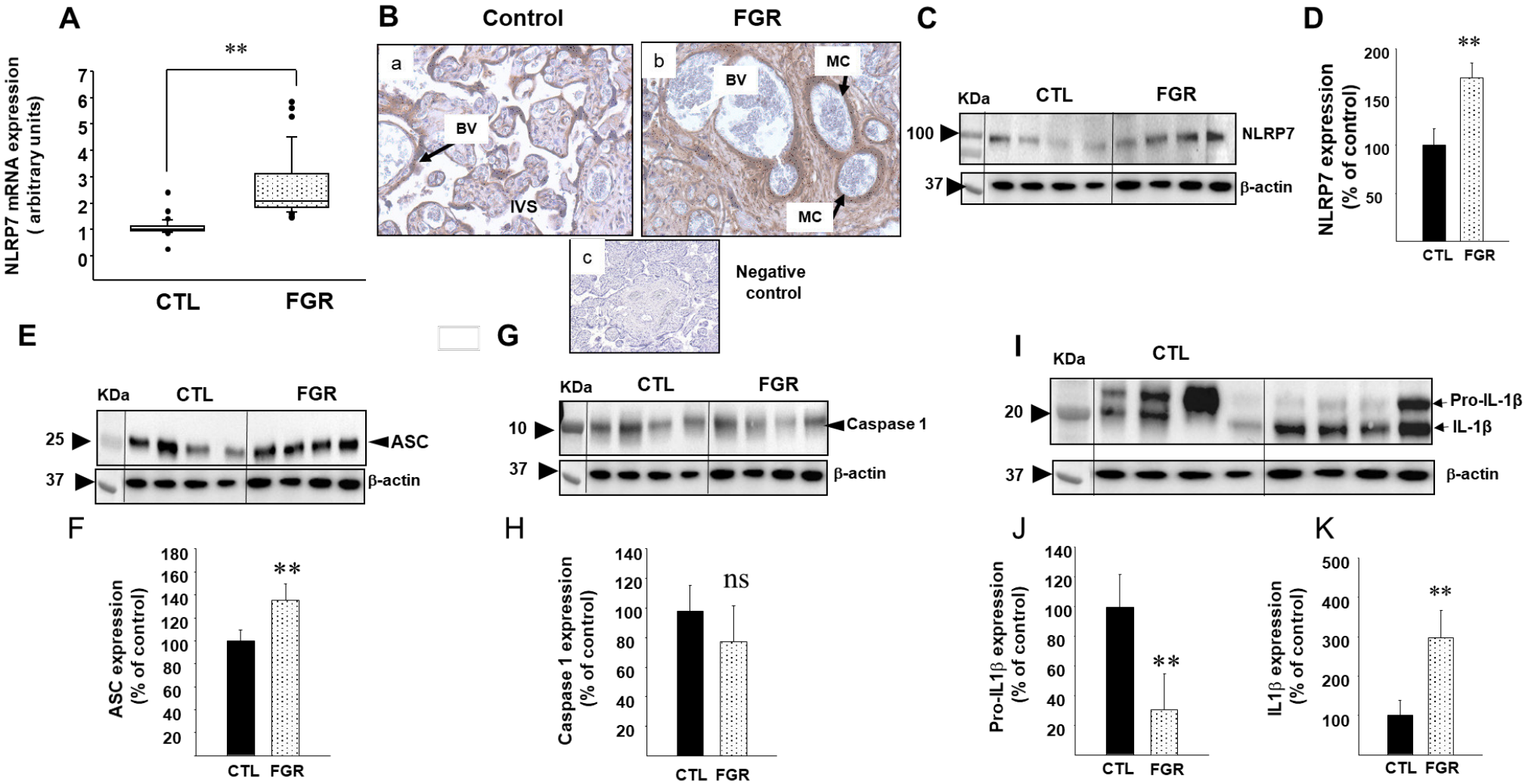

A
NLRP7 mRNA expression (arbitrary units)
**
CTL
FGR
B
Control
FGR
a
BV
IVS
b
BV
MC
MC
c
Negative control
C
KDa
CTL
FGR
100
37
NLRP7
β-actin
D
NLRP7 expression (% of control)
**
CTL
FGR
E
KDa
CTL
FGR
25
37
ASC
β-actin
G
KDa
CTL
FGR
10
37
Caspase 1
β-actin
I
KDa
CTL
20
37
Pro-IL-1β
IL-1β
β-actin
F
ASC expression (% of control)
**
CTL
FGR
H
Caspase 1 expression (% of control)
ns
CTL
FGR
J
Pro-IL1β expression (% of control)
**
CTL
FGR
K
IL1β expression (% of control)
**
CTL
FGR

Figure 7

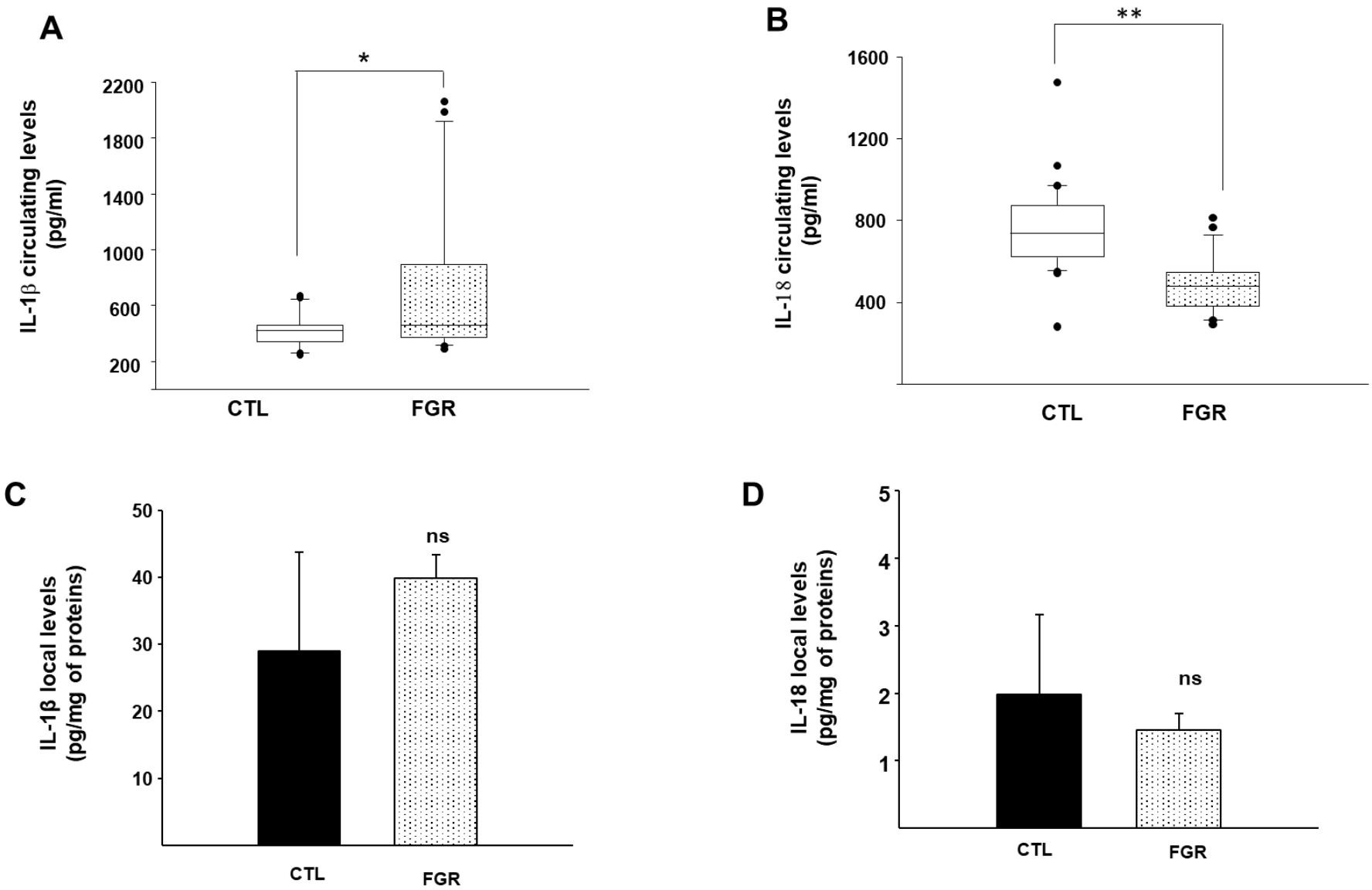

A
IL-1β circulating levels (pg/ml)
2200
1800
1400
1000
600
200
*
CTL
FGR
B
IL-18 circulating levels (pg/ml)
1600
1200
800
400
**
CTL
FGR
C
IL-1β local levels (pg/mg of proteins)
50
40
30
20
10
ns
CTL
FGR
D
IL-18 local levels (pg/mg of proteins)
5
4
3
2
1
ns
CTL
FGR

Figure S1

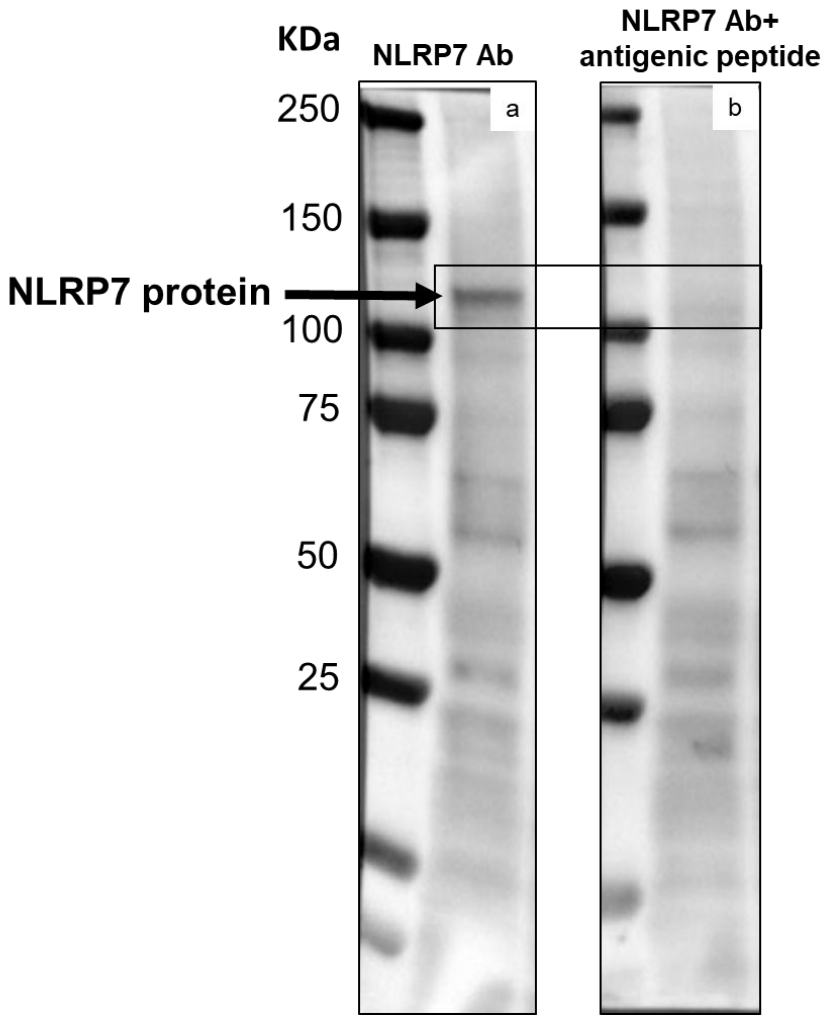

KDa
NLRP7 Ab
NLRP7 Ab+
antigenic peptide
250
150
100
75
50
25
NLRP7 protein
a
b

Figure S2

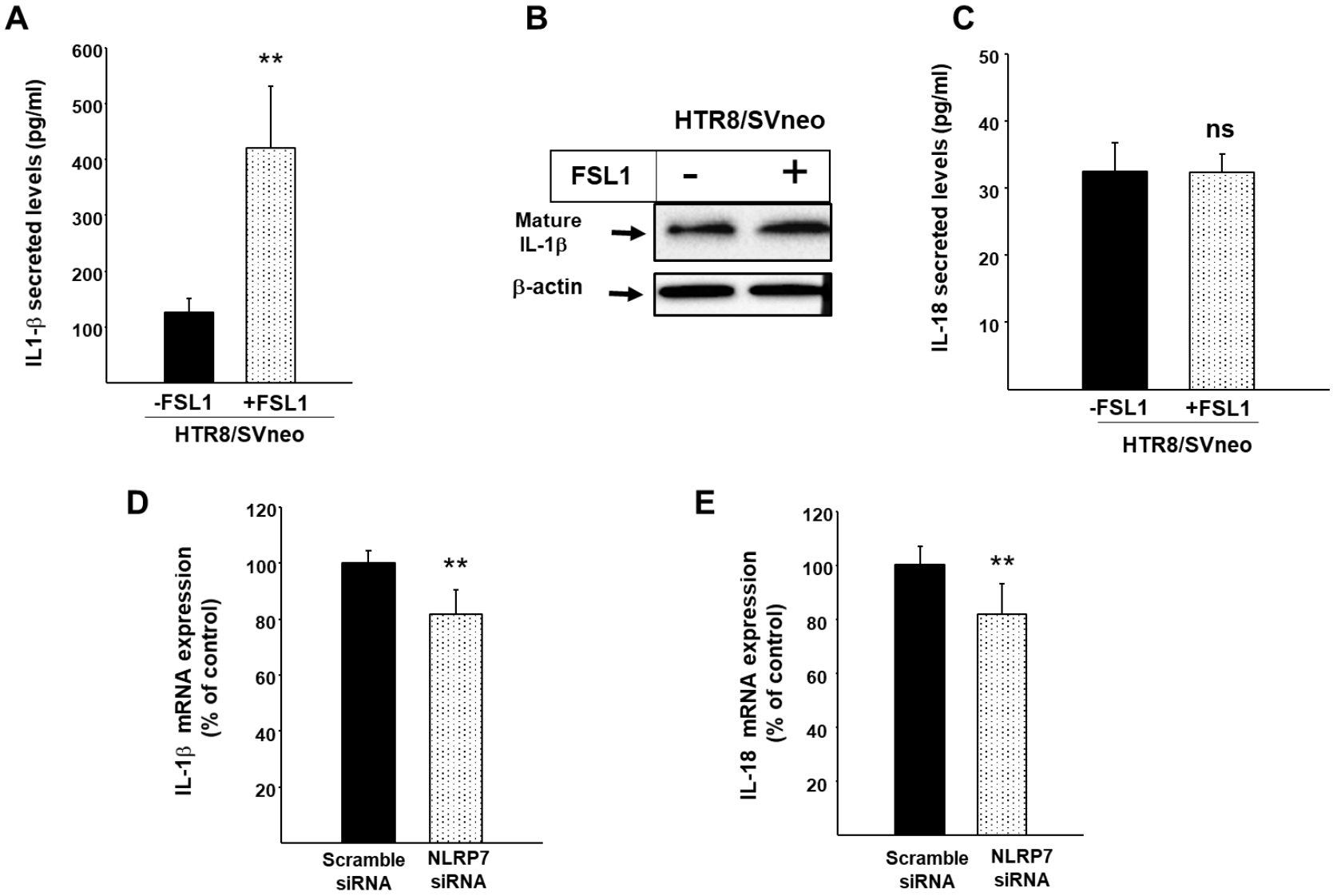

A
IL1-β secreted levels (pg/ml)
600
500
400
300
200
100
**
-FSL1
+FSL1
HTR8/SVneo
B
HTR8/SVneo
FSL1
-
+
Mature IL-1β
β-actin
C
IL-18 secreted levels (pg/ml)
50
40
30
20
10
ns
-FSL1
+FSL1
HTR8/SVneo
D
IL-1β mRNA expression (% of control)
120
100
80
60
40
20
**
Scramble siRNA
NLRP7 siRNA
E
IL-18 mRNA expression (% of control)
120
100
80
60
40
20
**
Scramble siRNA
NLRP7 siRNA

Figure S3

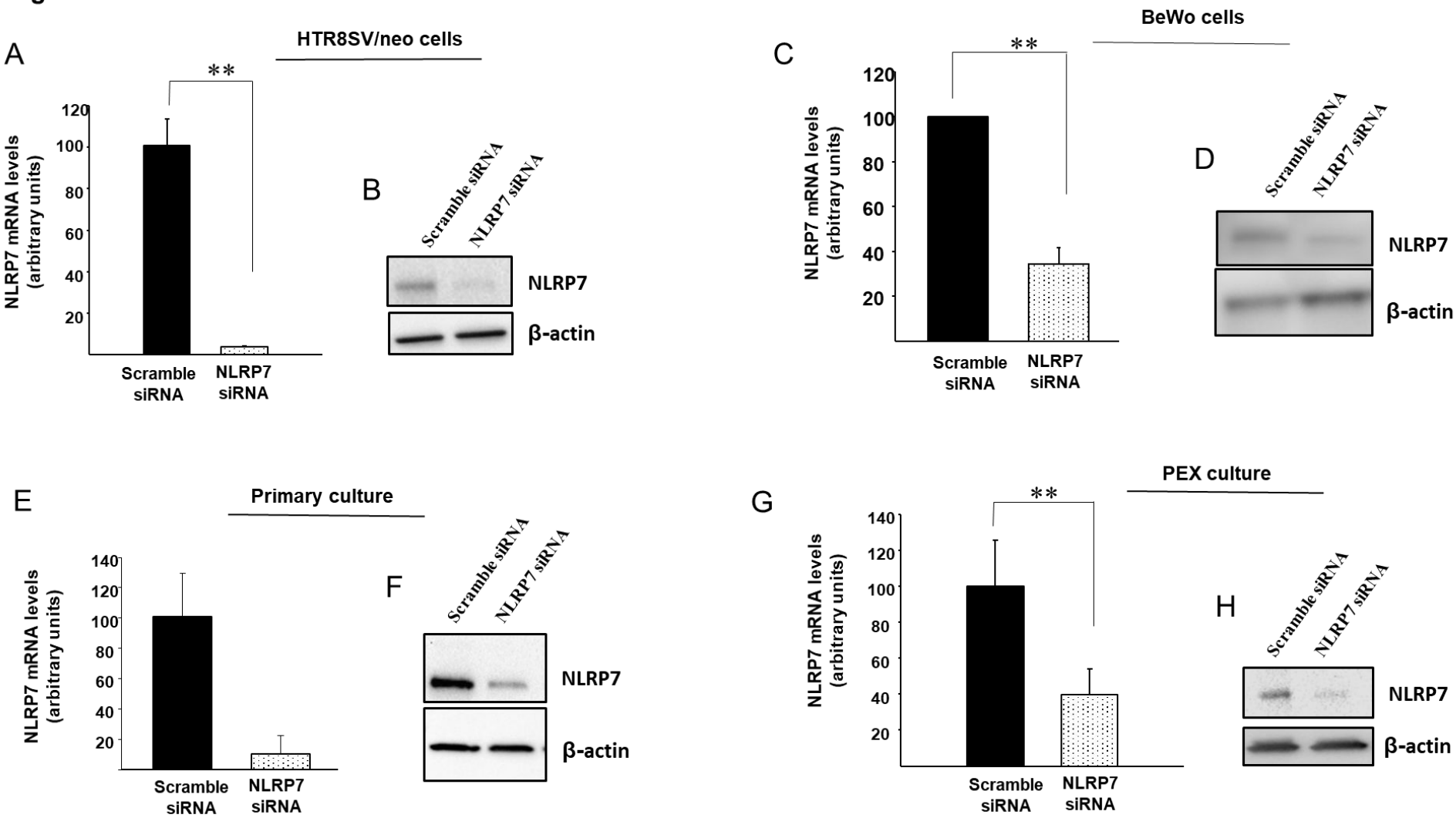

A
HTR8SV/neo cells
**
NLRP7 mRNA levels (arbitrary units)
120
100
80
60
40
20
Scramble siRNA
NLRP7 siRNA
B
Scramble siRNA
NLRP7 siRNA
NLRP7
β-actin
C
BeWo cells
**
NLRP7 mRNA levels (arbitrary units)
120
100
80
60
40
20
Scramble siRNA
NLRP7 siRNA
D
Scramble siRNA
NLRP7 siRNA
NLRP7
β-actin
E
Primary culture
NLRP7 mRNA levels (arbitrary units)
140
120
100
80
60
40
20
Scramble siRNA
NLRP7 siRNA
F
Scramble siRNA
NLRP7 siRNA
NLRP7
β-actin
G
PEX culture
**
NLRP7 mRNA levels (arbitrary units)
140
120
100
80
60
40
20
Scramble siRNA
NLRP7 siRNA
H
Scramble siRNA
NLRP7 siRNA
NLRP7
β-actin

Figure S4

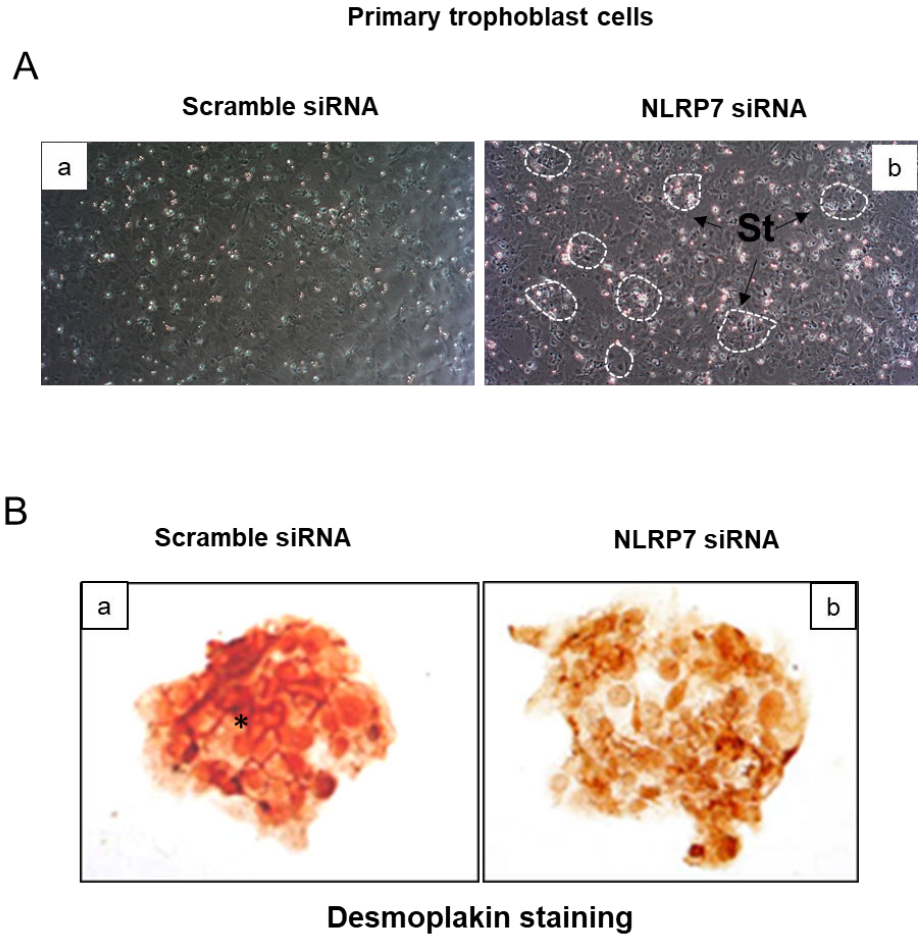
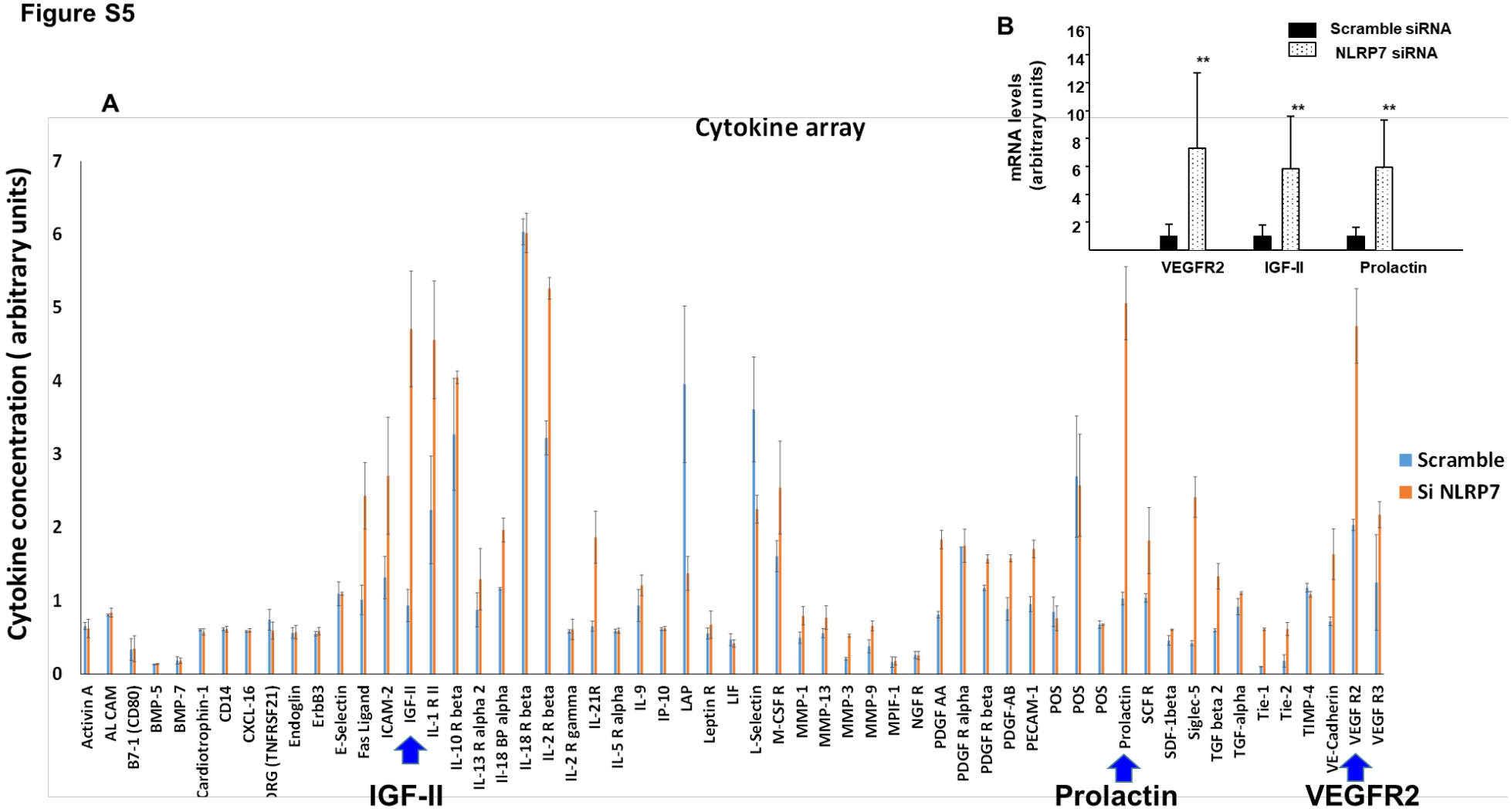

Primary trophoblast cells
A
Scramble siRNA
NLRP7 siRNA
a
b
St
B
Scramble siRNA
NLRP7 siRNA
a
b
*
Desmoplakin staining

Figure S5


A
Cytokine array
Cytokine concentration (arbitrary units)
0
1
2
3
4
5
6
7
Activin A
AL CAM
B7-1 (CD80)
BMP-5
BMP-7
Cardiotrophin-1
CD14
CXCL-16
DRG (TNFRSF21)
Endoglin
ErbB3
E-Selectin
Fas Ligand
ICAM-2
IGF-II
IL-1 R II
IL-10 R beta
IL-13 R alpha 2
Il-18 BP alpha
IL-18 R beta
IL-2 R beta
IL-2 R gamma
IL-21R
IL-5 R alpha
IL-9
IP-10
LAP
Leptin R
LIF
L-Selectin
M-CSF R
MMP-1
MMP-13
MMP-3
MMP-9
MPIF-1
NGF R
PDGF AA
PDGF R alpha
PDGF R beta
PDGF-AB
PECAM-1
POS
POS
POS
Prolactin
SCF R
SDF-1beta
Siglec-5
TGF beta 2
TGF-alpha
Tie-1
Tie-2
TIMP-4
VE-Cadherin
VEGF R2
VEGF R3
IGF-II
Prolactin
VEGFR2
Scramble
Si NLRP7
B
mRNA levels (arbitrary units)
2
4
6
8
10
12
14
16
Scramble siRNA
NLRP7 siRNA
**
**
**
VEGFR2
IGF-II
Prolactin

Supplemental material and methods

Immunohistochemistry and Immunofluorescence (IF)

Immunohistochemistry

Placental tissues from 6 to 14 wg and placental tissues of FGR and AMC (age matched control) were collected and fixed for 24 h at 4°C in 4% (vol/vol) paraformaldehyde, embedded in paraffin, and cut into 5-µm sections and proceeded as previously described [32]. Briefly, adjacent sections were stained using specific antibodies, and the avidin-biotin immunoperoxidase detection method was applied. Endogenous peroxidase activity was quenched by pretreatment with 3% (vol/vol) hydrogen peroxide in methanol for 30 min. Polyclonal rabbit antibodies were used to detect NLRP7 (14µg/µl, Covalab, France). Because NLRP7 and NLRP2 proteins exhibit high identity in their amino acid sequences, the immunogen peptide used to develop the NLRP7 antibody was 100% homologous to NLRP7 sequences, while having only 36% homology to NLRP2. For immunohistochemical detection, antibodies were incubated with the tissue sections overnight at 4°C. The tissue sections were subsequently washed three times with PBS and incubated with biotinylated goat anti-rabbit IgGs (1,1g/l, Dako, Denmark) for 1 h in a humid chamber. After three PBS washes, the slides were incubated with an avidin-biotin complex (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA) for 1 h. After a final PBS wash, the immunoreactive proteins were visualized after the addition of 3, 3-diaminobenzidine (Dako) for 2 min and then counterstained with hematoxylin. Zeiss AxioCam HRc coupled to a Zeiss Axioplan microscope were used to take photographs of the slides. Negative control section were either incubated with PBS in the absence of NLRP7 antibody, or with NLRP7 antibody that has been blockade by its immnogen peptide (20 times the concentration of NLRP7) in a competition experiment

Immunofluorescence (IF)

Placental tissues were incubated with primary antibodies. Both a monoclonal HLA-G (20µg/ml, Covalab, France) and NLRP7 (20µg/µl, Covalab, France) antibodies were used. Incubation was performed overnight at 4°C in PBS with 2% goat serum, 1% bovine serum albumin. Slides were then washed and incubated with secondary antibodies for 1 hour at room temperature and counterstained with Hoechst 33342. Images were taken by Zeiss AxioVision microscope, and processed using AxioVision SE64 Rel. 4.9.1 software.

Western blotting analysis

Protein preparation

Placental tissues or cell lines used to determine the expression of NLRP7 protein or the content of placental IL-1β and Il-18 were homogenized with a mixer (Polytron 1200 mixer, Bioblock Scientific, France) in RIPA (Tris-HCl 2,42g, NaCl 8,77g, sodium deoxycholate 5g, sodium dodecyl sulphate (SDS) 1g, Triton X-100 10ml, pH 8) containing a cocktail protease inhibitor (Sigma 105 Aldrich, MO). The supernatants obtained by centrifugation of homogenates (11,000 g at 4°C for 30 min) were collected and protein concentrations were determined using the micro BCA protein assay with a Multiscan EX (Thermo LabSystems) and Accent Software 2.6.

SDS-PAGE

Extracted proteins were mixed with 5X protein sample buffer (62 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% ß-mercaptoethanol, and 0.05% bromophenol blue as the tracking dye), and samples were heated at 95°C for

5 minutes. Samples were then separated on 4–20% SDS-PAGE gels and transferred into 0.22 µm nitrocellulose membranes (Bio-Rad) using a Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad).

The membranes were blocked in 5 % non-fat dry milk in PBS 0.1% Tween and incubated overnight at 4°C with anti-NLRP7 (3,4 µg/µl, Covalab, France), anti-Caspase-1 (0.5µg/ml, Santa Cruz, USA), anti-IL-1β (1µg/ml, Santa Cruz, USA) or anti-ASC (1µg/ml, Santa Cruz, USA) antibodies; this was followed by 1 hour of incubation with a matched horseradish peroxidase labeled secondary antibody (1:3000). Immunoreactivity was detected using chemiluminescence detection kit reagents and a ChemiDoc™ Station (Bio-Rad). Western blotting procedures were repeated at least 3 times per sample. To standardize for sample loading, the blots were subsequently stripped using a commercially available kit, following the manufacturer's instructions (Re-blot; Millipore), and reprobed with an anti-β-actin antibody (Sigma-Aldrich) as an internal control for protein loading [32].

HTR8/SVneo, BeWo and PEX transfection with NLRP7 SiRNA or Scrambled SiRNA

HTR8/SVneo, BeWo cells and placental explants were transfected with either NLRP7 siRNA or with Scrambled siRNA (Ambion, France). Lipofectamine RNAimax (Invitrogen, California) was used as transfecting agent according to the manufacturer's instruction. HTR8/SVneo and PEX were maintained for 48 hours and then harvested for further analysis (proliferation, migration and invasion assay) and BeWo cells for 72h to assess differentiation and apoptosis assays. In other experimental settings HTR8/SVneo cells were treated with FSL-1, a bacterial-derived toll-like receptor 2/6 agonist for NLRP7 at 0.1 µg/ml. Cells and PEX viability were assessed using trypan blue or measurement of secreted hCG, respectively [32].

RNA isolation and real-time PCR analysis

Total RNA was extracted from FGR, and AMC placental tissue using the Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) as described [32]. Reverse transcription was performed on 1 µg of total RNA (Invitrogen). Primers for NLRP7, ST1, ST2, β-hCG and 18S are listed in **Table 1**. We have also used the following primer references, Hs00176676-m1, Hs00277496-s1 and Hs00168730-m1 to detect VEGFR2, IGF-II, prolactin mRNA, respectively. mRNAs expression were quantified by real-time RT-PCR using a Bio-Rad CFX96 apparatus and GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI). PCR conditions were as follows: step 1, 94°C for 10 min; step 2, 45 cycles consisting of 95°C for 15 s, with temperature indicated in Table 1 for 5 s, and 72°C for 10 s. Relative quantification was performed using the comparative threshold (CT) method after determining the CT values for reference and target genes in each sample according to the $E^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Changes in mRNA expression level were calculated after normalization to 18S rRNA.

Proliferation Assay

Two assays were used to determine the role of NLRP7 in trophoblast proliferation, the Prestoblue assay and the 3h thymidine incorporation. For the Prestoblue assay, HTR8/SVneo cell line were seeded into 96-well plate at the density of 3 x 10^4/well. Proliferation was assessed using a fluorescence, and non-radioactive assay for assessing cell viability and proliferation (PrestoBlue® Cell Viability Reagent, Invitrogen), in the absence or presence of siRNA against NLRP7. Cells were cultured at 37 °C with 5% CO_2. 24 h later, 10µl of PrestoBlue®

was added in each well. After 30 min of incubation a plate reader (Fluorostar® OPTIMA Microplate Reader) was used to determine the fluorescence values at 535–560 nm [31].

For the Thymidine incorporation assay, HTR8/SVneo (7 x 10^4 cell/well), transfected by siRNA NLRP7 or by scrambled siRNA, 37°C, 5% CO2) were labelled with 0.5 µCi/ml [3H]-thymidine (Amersham, France) and were subsequently washed in HBSS and incubated in 2 ml ice-cold 5% trichloroacetic acid for 20 min at RT. After washing, 0.4 ml of 0.1 M NaOH and 0.1% SDS were added; the lysates were transferred into a vial containing scintillation liquid and the radioactivity was counted in a beta counter (Beckman, Germany).

Migration Assay

migration experiments were conducted using a conventional 24-well Transparent PET membrane (#353097, Corning®) with each well separated by a microporous polycarbonate membrane (8 µm pores) into an upper ("insert") and a lower chamber ("well"). After 24 hours of serum deprivation, cells were detached, counted and re-suspended in media without FBS to obtain equal cell densities (2×105 cells/insert). After 24 h Inserts were fixed and stained in duplicates. Cells were fixed and stained in a 20% methanol/0.2% crystal violet solution during three minutes at room temperature, followed by washing in deionized water to remove redundant staining. Non-migrated cells remaining at the upper side of the membranes were carefully removed with cotton swabs and inserts were dried in darkness overnight. The cells that invaded the chamber were visualized under the microscope and counted. [31].

Invasion Assay

The top chamber of a conventional 24-well Transparent PET membrane (#353097, Corning®) was precoated with 100 µl of 1:3 Matrigel (Corning® Matrigel®); 2 X10^4 HTR8/SVneo cells/insert were seeded in 500 µl of RPMI 1640 medium with 1% FBS. The inserts were placed into 24-well plates containing 750 µl of RPMI 1640 medium with 15% FBS. Cells were treated with SiRNA. After 24 h Inserts were fixed and stained in duplicates. Cells were fixed and stained in a 20% methanol/0.2% crystal violet solution during three minutes at room temperature, followed by washing in deionized water to remove redundant staining. Non-migrated cells remaining at the upper side of the membranes were carefully removed with cotton swabs and inserts were dried in darkness overnight. The cells that invaded the chamber were visualized under the microscope and counted [31].

Differentiation assays

BeWo cells were seeded in 6-well plates (2X10^5 cells/well) and treated with NLRP7 siRNA or SiRNA Scrambled for 72 h, differentiation potential of BeWo was determined by measuring the concentrations of β-hCG protein in the culture media by ELISA (Alpha Diagnostic International, Australia). The minimum detection limit of this assay was 1.5 mIU/mL. Additional marker for trophoblast fusion was determined by using syncytin- and 1 and 2 (real-time PCR and immunoblotting) and desmoplakin (immunoblotting).

Human apoptosis cDNA array

Human apoptosis cDNA array (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was used for gene profiling and to screen for genes that showed differential expression in cultured BeWo cells treated with NLRP7 siRNA and SiRNA Scrambled. Briefly, cDNA was prepared and pooled from three independent experiments were added to a TaqMan mastermix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and distributed in a TaqMan Array 96-well

plate at approximately 2ng/well in a 20µL reaction. The array plate contained 84 gene-specific primer sets with a panel of five house-keeping gene primers for normalisation. The house-keeping genes consisted of 18S ribosomal RNA (18S), β-2-microglobulin (B2M), Hypoxanthine phosphoribosyltansferase 1 (HPRT1), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and β-actin (ACTB).

The PCR reaction was performed in the 7500 PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) under the following cycling parameters: 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 seconds and primer extension at 60°C for 1 minute. Data (Ct values) were analysed using the ABI Sequence Detector System software version 2.0 and the relative gene expression values were normalized to the five house-keeping genes using the DataAssist Software v3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Candidate genes were identified from the fold change differences observed in NLRP7 siRNA treated cells relative to SiRNA Scrambled treated cells.

Human Cytokine array

RayBio™ **arrays (RayBiotech Inc., Norcross, GA)** were used to detect cytokine analysis in the conditioned media of the cultured BeWo cells treated with siRNA Scrambled or NLRP7 siRNA, according to the manufacturer's recommendation. Briefly, the membranes were blocked and incubated with biotin-conjugated antibodies and finally, incubated with horseradish peroxidase-conjugated streptavidin. Chemiluminescence was detected with a LAS-1000 device (Fujifilm, Tokyo, Japan), and the data were digitized and analyzed with **ImageQuant** software in volume integration mode (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). By subtracting the background staining and normalizing to the positive controls on the same membrane, relative protein densities for each membrane were obtained and the fold difference in protein concentration was calculated.

Quantitation of candidate Cytokines

BeWo cells were seeded in 6-well plates ($2X10^5$ cells/well) and treated with NLRP7 siRNA or SiScrambled for 72h, cytokine concentrations in the culture media was quantitated by Human Quantikine ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, USA).

Caspases 1, 3 and 8 activity assays

Caspase 1 (ALX-850-211-KI01, Enzo Lifesciences), 3 and 8 activity assays (ApoAlert® Caspase Colorimetric assay, Clontech Laboratories Inc, Mountain View, CA, USA) were measured in cultured BeWo cells according to the manufacturer's instructions. Chromogen absorbance was measured at 405 nm using the SPECTRAmax PLUS microplate reader (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA, USA).

Functional analysis of BeWo cells using the xCELLigence system

The differentiation of BeWo cells was monitored for 72 hours and analysed using the E-Plate 16 (ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA) in the real-time electrical impedance based xCELLigence system (ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA), according to the manufacturer's protocol. Briefly, cells were seeded at a density of $1x10^4$ and treated with NLRP7 siRNA and or SiScrambled. Electrical impedence was measured and the data are expressed as arbitrary cell indeces (CI).

II. Résumé des résultats

L'ensemble des résultats obtenu dans cette publication nous a permis de dresser les conclusions suivantes :

- La protéine NLRP7 est principalement exprimée par les cellules trophoblastiques et les cellules de Hoffbauer au sein de la villosité placentaire ;
- La protéine NLRP7 est abondamment exprimée au cours du premier trimestre de la grossesse et en particulier et en particulier aux temps précoces de la mise en place placentaire jusqu'à 10 SA ;
- L'expression de la protéine NLRP7 est régulée par un paramètre clé de la placentation se modifiant à cette âge gestationnel, 10 – 11 SA, du fait de la mise en place de la circulation fœto-maternelle : la tension en d'oxygène ;
- Grâce au « knockdown » de l'expression du gène *NLRP7* dans les cellules HTR8/SVneo, nous avons démontré que la protéine NLRP7 participe au contrôle la différentiation du cytrophoblaste vers le syncytiotrophoblaste ou vers la cellule invasive extravillositaire et augmente sa prolifération au cours du premier trimestre de la grossesse ;
- Les niveaux d'expression de la protéine NLRP7 ainsi que deux effecteurs de l'inflammasome, l'ASC et l'IL-1β, sont augmentés dans le RCIU idiopathique.

III. Discussion

Ce travail descriptif de l'expression de la protéine NLRP7 dans le placenta normal et comparatif de ses niveaux d'expression dans le contexte d'une grande pathologie de la grossesse, nous a permis de mettre en lumière une protéine jusque-là principalement étudiée pour les aspects génétiques associés au développement de môles hydatiformes.

Notre étude sera la première à proposer un rôle de la protéine NLRP7 dans le développement placentaire physiologique. L'absence de ce type d'étude dans la littérature peut s'expliquer tant par le fait que la famille des inflammasomes n'a été que récemment identifiée et qu'un intérêt plus important est porté à NLRP3, plus ubiquitaire, que par le fait qu'elle soit spécifique à l'espèce humaine. Cette dernière caractéristique limite fortement les investigations par utilisations de modèles animaux. Chez la souris, la protéine la plus proche de NLRP7 est NLRP2.

NLRP7 et angiogenèse placentaire

Nous avons démontré que NLRP7 est exprimée dans les trophoblastes mais aussi au niveau des cellules endothéliales des microvaisseaux intravillositaires. Cette expression endothéliale semblait plus importante dans les placentas issus de RCIU avec une expression exacerbée dans la couche musculaire couvrant les vaisseaux intravillositaires. Cette observation interroge sur le rôle de la protéine NLRP7 dans la vascularisation et l'angiogenèse placentaire, aspects majeurs du développement de cet organe. Il serait intéressant de mener des études sur le rôle de NLRP7 dans les cellules endothéliales et musculaires des microvaisseaux placentaires. A ce jour, aucune étude ne rapporte le rôle des membres de la famille des NLRPs dans l'angiogenèse placentaire.

NLRP7 et Prééclampsie

Comme décrit dans l'introduction de ce manuscrit, des études ont établi une association entre les grossesses môlaires et la survenue de prééclampsies précoces, avant 20 SA, chez ces patientes. Cette première association, ajoutée aux résultats de l'article démontrant l'implication de NLRP7 dans la pathologie du RCIU, nous laisse penser qu'il serait intéressant de rechercher le statut de la protéine NLRP7 ainsi que celui des effecteurs de son inflammasome dans la pathologie de la prééclampsie.

Article 2

La protéine NLRP7 est impliquée dans le développement du choriocarcinome *in vitro* et *in vivo*

I. Contexte et présentation de la publication

L'idée de caractériser le rôle de la protéine NLRP7 dans le développement et la progression du choriocarcinome émane de travaux sur le choriocarcinome menés par notre groupe au cours des cinq dernières années. L'étude publiée par Traboulsi *et al.* en 2017 a concerné le rôle du facteur angiogène EG-VEGF dans le développement et la progression de ce cancer. La mise en place de protocoles et le développement de technologies pour l'étude de ce cancer, au sein de notre groupe, a permis d'envisager en projet principal de ma thèse la caractérisation du rôle de la protéine la plus encline d'expliquer la tumorigenèse des MH et des CC, la protéine NLRP7.

Les résultats de notre première publication, actuellement en révision, ont démontré que la protéine NLRP7 est majoritairement exprimée dans le placenta aux âges gestationnels précoces de la grossesse (6-10 SA) et qu'elle joue un rôle critique dans le contrôle des processus clés du développement placentaire. En effet, NLRP7 augmente la prolifération et inhibe la migration et l'invasion des trophoblastes non tumoraux. De plus, son expression est régulée par l'hypoxie et la β-hCG, deux paramètres majeurs du développement physiologique du placenta mais aussi du développement des tumeurs trophoblastiques.

Les mutations du gène codant pour la protéine NLRP7 sont étroitement liées à la survenue des môles biparentales (Murdoch, 2006) qui constituent un sous-type de MHC. Ces dernières peuvent, dans près de 20 % des cas, donner lieu à un véritable cancer malin du placenta, le choriocarcinome (Noal, 2010 ; Golfier, 2010). Le CC gestationnel est un cancer agressif formé de cellules tumorales hautement prolifératives avec un pouvoir métastatique important. Dans le contexte du cancer, la protéine NLRP7 a été décrite pour jouer un rôle important dans la prolifération des cellules germinales tumorales. Dans le cas du choriocarcinome testiculaire (Okada, 2004) et dans le cas du cancer de l'endomètre, son expression a été corrélée à une invasion plus profonde des cellules tumorales et a un mauvais pronostic (Ohno, 2008). L'ensemble de ces données suggérait fortement que la protéine NLRP7 pouvait être un acteur important du développement et de la progression des MH et du CC.

Afin de déterminer le rôle de NLRP7 dans les grossesses tumorales, nous avons suivi trois axes de recherche. Le premier, clinique, nous a permis de déterminer les niveaux d'expression de la protéine NLRP7 et de ses partenaires de l'inflammasome dans les tissus môlaires et choriocarcinomateux. Cette étude nous a aussi permis de déterminer le statut inflammatoire des patientes incluses. Le second axe est une étude *in vitro*. Dans cette étude, nous avons utilisé deux lignées commerciales de cellules trophoblastiques : la lignée non tumorale HTR8/SVneo et la lignée tumorale JEG-3 pour caractériser les niveaux d'expression de NLRP7 et de ses partenaires. La poursuite de la caractérisation du rôle de la protéine NLRP7 *in vitro* s'est uniquement réalisée sur la lignée tumorale. Dans ce type cellulaire, nous avons étudié la régulation de l'expression de NLRP7 par les deux paramètres clés des développements placentaire et tumoral : le taux d'oxygène et celui de l'hCG. Pour une caractérisation plus approfondie du rôle de la protéine NLRP7, nous avons inhibé son expression par stratégie ShRNA. Les processus de prolifération, de migration et d'invasion ainsi que la capacité des cellules à pousser en absence d'ancrage ont ainsi été comparés entre les cellules JEG-3 contrôles et sous-exprimant le gène *NLRP7*.

De par l'association très étroite des mutations du gène *NLRP7* et du développement des MH, la découverte du rôle de la protéine NLRP7 dans la tumorigenèse du choriocarcinome représente un enjeu majeur pour une meilleure compréhension de la physiopathologie des maladies gestationnelles trophoblastiques. Elle pourrait permettre de mettre en évidence de nouveaux biomarqueurs pronostiques de l'évolution du CC et/ou de nouvelles pistes thérapeutiques. Les résultats obtenus suite aux deux premiers axes de recherches ont fortement suggéré une implication de NLRP7 dans le développement et la progression du CC. Afin de tester cette hypothèse, nous avons développé trois modèles de souris qui ont apporté chacun une information sur le rôle de cette protéine dans la tumorigenèse du choriocarcinome. Le premier modèle étant celui du choriocarcinome orthoptique développé par notre équipe, présente l'avantage majeur de mimer au plus près le développement primaire de la tumeur trophoblastique. Dans ce modèle, les cellules sont injectées dans la décidue maternelle du placenta à 7.5 jpc et les animaux euthanasiés à 19.5 jpc, soit après 12 jours de développement tumoral. Le 2e modèle a consisté en l'injection des cellules JEG-3 dans la corne utérine de souris non gestantes. Ce modèle permet de caractériser le développement tumoral en dehors de l'imprégnation hormonale placentaire. Afin de comparer ce dernier modèle au modèle placentaire, nous avons été contraints d'arrêter les expériences 12 jours après l'injection.

Ce court laps de temps n'ayant pas permis de conclure quant au rôle de NLRP7 dans la progression tumorale, nous avons développé, en parallèle, un modèle métastatique de CC par injection des cellules tumorales directement dans la veine de la queue et avons suivi les animaux sur plusieurs semaines.

L'ensemble des résultats obtenus lors de ce travail est exposé dans la publication qui va suivre. Comme pour la première publication, ce projet a bénéficié de collaborations nationales et internationales. Les collaborations à ces deux échelles ont été indispensables du fait de la rareté des échantillons môlaires et choriocarcinomateux en France. Nous avons ainsi collaboré avec le centre de référence des maladies gestationnelles trophoblastiques à Lyon (Dr. PA Bolze), le centre de maladies gestationnelles au CHU de Casablanca (Pr H. Boufettal) et avec le centre de génétique des maladies trophoblastiques à l'Université de Mc Gill (Pr R. Slim).

NLRP7 protein promotes placental choriocarcinoma growth *in vitro and in vivo*.

D. Reynaud[1,2,3], R. Abi Nahed [1,2,3], R. Slim[4], PA. Bolze[5,6], F. sergent[1,2,3], H. Boufettal[7], O. Cochet[1,2,3], M. Benlahfid[7], T. Aboussaouira[7], M. Benharouga[2,3,8], and N. Alfaidy[1,2,3].

Brief title: Role of NLRP7 in choriocarcinoma development

1. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 1036, Grenoble, France
2. University Grenoble-Alpes, 38000, Grenoble, France
3. Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA), Biosciences and Biotechnology Institute of Grenoble, Grenoble, France
4. Department of Human Genetics, McGill University Health Centre Research Institute, Montréal, QC, Canada.
5. University of Lyon 1, University Hospital Lyon Sud, Department of Gynecological Surgery and Oncology, Obstetrics. France.
6. French Reference Center for Gestational Trophoblastic Diseases, University Hospital Lyon Sud, 165, Chemin du Grand Revoyet, 69495 Pierre Bénite, France.
7. University Hassan II, Casablanca. Faculty of Medicine and Pharmacy. Ibn Rochd Hospital of Casablanca, Obstetrics and Gynecology department, Morocco.
8. Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 5249, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, Grenoble, France.

Key words: NLRP7 inflammasome, choriocarcinoma, pregnancy, animal model

Financial support: We acknowledge the following sources of funding: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (U1036), University Grenoble-Alpes, Commissariat à l'Energie Atomique (DSV/BIG/BCI), Région Auvergne-Rhône-Alpes through Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône-Alpes, Ligues Départementales (Isère et Savoie) contre le Cancer and Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) SPF20150934074. Ms Déborah Reynaud was supported by Région Auvergne-Rhône-Alpes.

The authors declare no potential conflicts of interest.

Corresponding author: Nadia Alfaidy
Unité INSERM U1036. Laboratoire BCI -BIG
CEA Grenoble 17, rue des Martyrs
38054 Grenoble cedex 9
Tel. 04 38 78 35 01
Fax 04 38 78 50 58
nadia.alfaidy-benharouga@cea.fr

Abstract

NLRP7 is a member of a family of proteins involved in intracellular inflammatory processes. Recent studies established a tight association between mutations in *NLRP7* and the risk of developing gestational choriocarcinoma (CC). CC is the most malignant trophoblastic disease that often develops from complete hydatidiform moles (CHM). We recently demonstrated that NLRP7 is highly expressed in the human placenta with a critical role in the control of normal trophoblast proliferation. Yet, the characterization of its role in the development and progression of CC is still unknown.

Three approaches were used, ***i)*** a clinical investigation comparing the level of expression of NLRP7 inflammasome in placental tissues and in sera collected from control (n=20), from a distinctive CHM (n=38) and CC (n=9) cohorts, ***ii)*** an *in vitro* study investigating the effects of NLRP7 knockdown on the proliferation, migration and invasion of the CC cell line, JEG-3, using 2D, 3D culture, and time lapse live imaging systems ***iii)*** an *in vivo* study that used the newly developed orthotopic CC and metastatic mouse models to compare the tumorigenic potential of JEG-3-luciferase-control versus JEG-3 knockdown for NLRP7 (Sh NLRP7).

Both placental NLRP7 inflammasome and circulating inflammatory effectors were deregulated in CHM and CC patients. NLRP7 knockdown decreased JEG-3 proliferation, and increased their migration and invasion both in 2D and 3D systems. Injection of Sh-NLRP7 cells in the vein, in the uterine horn or in the placenta of gravid mice induces a reduced tumor growth and progression. Immunohistological analyses further deciphered the mechanism by which NLRP7 promotes CC tumorigenesis.

Our work characterized the critical role of NLRP7 in CC development and progression and brought evidences that NLRP7 could be targeted for CC therapy.

Introduction

NLRP7 (previously known as NALP7) is a member of the NOD-like receptors (NLR); a family of proteins that play a crucial role in the innate immune response. The NLRs are activated within the cell by pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) or by the damage associated molecular patterns (DAMPs) {Bianchi, 2007 #114;Chen, 2010 #115}. Among functions achieved by activated NLRs is the inflammasome formation {Kufer, 2011 #131}. The inflammasome is defined as an intracellular multimeric protein complex that contains a sensor receptor (NLR) {Kufer, 2011 #131}, an adaptor protein called ASC {Kim, 2016 #200;Kufer, 2011 #131} and an effector enzyme, the caspase-1. This complex catalyzes a cellular reaction to protect against an immediate danger resulting in the processing and maturation of pro-inflammatory cytokines, the interleukin (IL)-1β and IL-18 {Davis, 2011 #133;Kufer, 2011 #131}. Beside its pro-inflammatory role against immediate dangers, NLRP7 has also been reported to exhibit anti-inflammatory processes through a feedback control of IL-1β secretion {Kinoshita, 2005 #233;Messaed, 2011 #110}. This effect was observed in settings where NLRP7 was overexpressed {Messaed, 2011 #110}.

NLRP7 has extensively been studied in relation to the female reproductive system, as mutations in *NLRP7* gene are associated with gestational trophoblastic diseases (GTD), including gestational choriocarcinoma (CC) {Murdoch, 2006 #111}. CC is a malignant trophoblastic tumor that may develop after normal or abnormal pregnancies. GTD may develop after complete (CHM) or partial (PHM) hydatidiform moles, spontaneous abortions, or ectopic pregnancies {Froeling, 2014 #35;Stevens, 2015 #91}. CHM develops when one or two spermatozoa fertilize an oocyte in the absence of the maternal pronucleus, while PHM results from dispermic fertilization of a nucleated oocyte {Froeling, 2014 #35;Stevens, 2015 #91}. Both CHM and PHM patients are at high risk of developing CC, nevertheless this risk is much higher after CHM (5-20%) than after PHM (2-3%) {Radian, 2013 #117}. CC has an estimated incidence of 2 to 7 in 100,000 pregnancies in North America and Europe. This incidence is higher in Africa {Boufettal, 2014 #26;Cisse, 2002 #65} and even higher in Asia, where it reaches 5 to 202 in 100,000 pregnancies {Altieri, 2003 #37;Smith, 2003 #38}. One of the main features of CC is the excessive proliferation of trophoblast cells that ultimately results in an increased pool of cells acquiring a migratory and invasive phenotype {Savage, 2015 #39}.

CC is also highly metastatic due to the intrinsic invasive property of trophoblastic cells {Grummer, 1999 #179}. A recent study from our group showed that NLRP7 is highly expressed in the human placenta during the first trimester of pregnancy and that this protein plays a critical role in the control of key developmental processes of the placenta. In normal placenta, NLRP7 increases trophoblast proliferation and controls its differentiation (Abi Nahed, R, 2018, revised). In relation to cancer, NLRP7 has been reported to be associated with poor prognosis of endometrial cancer {Ohno, 2008 #237} and plays a crucial role in testicular tumorigenesis {Okada, 2004 #238}.

Altogether, these findings suggest that NLRP7 could be a potential actor in CC development and progression with the perspective of the use of its inflammasome machinery as therapeutic target. Though, no studies have investigated its involvement in the development and/or progression of choriocarcinoma. Here, we conducted ***i)*** a clinical study to investigate NLRP7 status in CHM and CC, ***ii)*** an *in vitro* study, using the human choriocarcinoma cell line, JEG-3, to characterize NLRP7 effects on its proliferation, migration, and invasion using both 2D and 3D culture systems. Moreover, we used our newly developed animal model of orthotropic CC to compare the effect of *NLRP7* knockdown on the development of CC from JEG-3 cells injected in the placenta of immunodeficient gravid mice. To determine the contribution of the placental environment on CC development, we determined the tumorigenic potential NLRP7 invalidated JEG-3 upon their injection in the uterine horn and the in the tail vein of non-gravid mice.

Material and methods

Human study

Normal and pathological human tissue and sera:

Pathological materials consisted of placental tissues and sera from patients with CHM (n=38) and CC (n=9) that were collected at Ibn Rochd Hospital in Casablanca, McGill University Health Centre Research Institute and the French Reference Center for Gestational Trophoblastic Diseases. Sera and placental tissues were also collected from women with normal pregnancies in the first trimester (n=20). Collection and processing were approved by the local hospital ethics committees, and informed patient consent was obtained from all cases. **Table 1** summarizes all clinical information about pathological pregnancies.

Cell culture

JEG-3 cell line culture

JEG-3 (ATCC® HTB-36™) is one of six clonally derived cell lines isolated from the Woods strain of the Erwin-Turner tumor by Kohler and associates {Kohler, 1971 #50}. JEG-3 cells were used as a CC cell line model. JEG-3 were cultured in DMEM: F12, 10% fetal bovine serum (FBS) and systematically tested for mycoplasma and used between 4 and 10 passages. Cells were maintained at 37°C under normoxic (20 % O_2) or hypoxic (1.5% O_2) conditions.

HTR8/SVneo culture

The human normal extravillous trophoblast cell line, HTR8/SVneo (ATCC® CRL3271™), were derived by transfecting the cells that grew out of chorionic villi explants of human first trimester placenta with the gene encoding for simian virus 40 large T antigen. HTR8/SVneo cell line was used between 24 and 30 passages and grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS, penicillin-streptomycin, and amphotericin B (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Cells were maintained at 37°C under normoxic (20 % O_2) or hypoxic (1.5% O_2) conditions. In some experiments, both JEG-3 and HTR8/SVneo cells were treated by FSL-1, a bacterial-derived toll-like receptor 2/6 agonist for NLRP7 at 0.1 µg/ml (23).

JEG3-Luc cell line preparation

JEG3-Luc (Luciferase positive JEG-3) were prepared using a lentivirus supernatant (pLenti-II-CMV-Luc-IRES-GFP control vector). The protocol was performed according to the company's instructions (Applied Biological Materials Inc.).

Briefly JEG-3 cells were plated in DMEM: F12 (1/1) medium supplemented with 10% FBS. Cells were infected for 6 h with lentivirus at a ratio of 1:1 in fresh culture medium. Infected cells were selected with Neomycin (200 µg/ml) for 7 days.

JEG3-Sh-NLRP7 cell line preparation

JEG3-Sh-NLRP7 (NLRP7 knockdown JEG3-Luc) were prepared using a lentivirus supernatant prepared from bacteria transformed by Sh-NLRP7 plasmids (MISSION pLKO.1-puro; Sigma-Aldrich). A total of 5 different plasmids containing specific target sequences were tested in parallel (**Table 2**). The protocol was performed according to the company's instructions (Sigma-Aldrich). JEG-3 cells were infected for 4 h with lentivirus at a ratio of 1:2 in complete medium supplemented with Polybrene (8 µg/ml, Sigma-Aldrich). Infected cells were selected with Puromycin (200 µg/ml) for 7 days.

ELISA

The inflammatory cytokines IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10 and TNFα were purchased from PeproTech Company (PeproTech, France). IL-18 Elisa kit was purchased from (R&D, France). Cytokines levels were assessed in the collected sera. ELISA tests were performed following the Manufacturer's protocols. All samples were in the linear range of the standard curves.

2D culture system:

Proliferation Assay

JEG3-Sh-CTL and JEG3-Sh-NLRP7 were compared for their proliferating rate using both cell counting and a non-radioactive assay (PrestoBlue® Cell Viability Reagent, Invitrogen). Cells were cultured at 37 °C with 5% CO2. 24 h later, cells were trypsinized and counted or supplemented with 1/10 of PrestoBlue® reagent in each well. After 30 min of incubation a plate reader (Fluorostar® OPTIMA Microplate Reader) was used to determine the fluorescence values at 535–560 nm.

Wound-healing

JEG3-Sh-CTL and JEG3-Sh-NLRP7 were seeded in 96 well plate. At confluence cells were scratched with the WoundMaker™ (essenBioscience), washed with PBS Ca^{++}/Mg^{++} and treated with Mitomycin C at 500ng/ml (Sigma Aldrich, France) in complete medium.

The closure of the wound was followed up to 48h and analyzed using the Incucyte Scratch wound protocol defined by the manufacturer (EssenBioscience).

Migration and Invasion assays in cell culture inserts

JEG3-Sh-CTL and JEG3-Sh-NLRP7 were labelled 1 hour with DiI (Invitrogen, France). Labeled cells (2.10^5) were seeded in DMEM: F12 without FBS in cell culture inserts (Corning, France) with Matrigel coating (1 mg/ml, BD). Cell invasion was stopped after 48h. Cell migration was assessed using the same protocol but without Matrigel coating. Cell migration was stopped after 24h. Filter inserts were fixed with PFA 4% and preserved in Fluorsave (Millipore, France). Images were taken using Zeiss AxioVision microscope, processed using AxioVision SE64 Rel. 4.9.1 software and analyzed using ImageJ software.

3D culture system:

Anchorage-independent Spheroids formation

Confluent monolayers Sh-CTL and JEG3-Sh-NLRP7 cells were trypsinized. 1500 cells from each cell type were suspended in DMEM: F12 supplemented with 10% FBS and seeded in non-adherent round-bottom 96-well plates (Greiner, Germany) pre-coated with Poly-HEMA (Poly (2-hydroxyethyl methacrylate), sigma Aldrich). Under these conditions all suspended cells contributed to the formation of a single JEG-3 cell spheroid specimen. The kinetic each spheroid's growth was assessed using a time lapse imaging system (Incucyte, EssenBioscience). Quantification of the spheroid growth of JEG3-Sh-CTL and JEG3-Sh-NLRP7 were analyzed using ImageJ software after 7 days of culture. At least six replicates for each cell type were included within each experiment.

Anchorage-independent colony formation assay in soft agar

Base Agar containing 0.6% (w/v) of Noble Agar (Becton Dickinson) dissolved in complete JEG-3 growth medium was plated in 12-well plate and dried 1h at room temperature. 30 000 JEG3-Sh-CTL and JEG3-Sh-NLRP7 were suspended in 0.3% (w/v) of soft agar in complete growth medium and plated at the top layer of the base agar. After 14 days of growth, colonies were stained with 10% Coomassie Brilliant Blue (R250 staining solution, Biorad Laboratories, Inc) overnight at 4°C. Images were taken by Zeiss AxioVision microscope and processed using AxioVision SE64 Rel. 4.9.1 software. ImageJ software was used to determine the total number and size of the colonies.

Western blot analysis

Protein extracts were prepared as previously described {Brouillet, 2013 #23}. NLRP7 antibody was used at 1.3 µg/µl (Covalab France), anti-Caspase-1 at 0.5µg/ml (Santa Cruz), anti-IL-1β at 1µg/ml (Santa Cruz) or anti-ASC at 1µg/ml (Santa Cruz) and anti-CA9 at 1 µg/ml (Novus). Immunoreactivity was detected using chemiluminescence detection kit reagents and a Chemidoc Station (Bio-Rad). To standardize for sample loading, the blots were subsequently stripped using a commercially available kit, following the manufacturer's instructions (Reblot mild solution, Millipore), and reprobed with an anti-β-actin antibody (Sigma-Aldrich) as an internal control for protein loading.

Immunohistochemistry of human placentas

Human placental tissues were collected from normal pregnant women during the first trimester of pregnancy and from patients with CHM or CC. Tissues were processed as described previously {Traboulsi, 2017 #141}. NLRP7 antibody was used at 13.6 µg/ml (Covalab France).

RNA isolation and real-time PCR analysis

Total RNAs were extracted from CHM and age-matched control placental tissue using the Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) as described in Brouillet et al, 2010. Total RNAs from HTR8/SV neo and JEG-3 cells were extracted using Macherey Nagel RNA extraction kit according manufacturer protocol. Reverse transcription was performed on 1 µg of total RNA (Iscript, Biorad). Primers used are listed in **Table 3**. All mRNA expressions were quantified by real-time RT-PCR using a Bio-Rad CFX96 apparatus and GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI). PCR conditions were as follows: step 1, 94°C for 10 min; step 2, 45 cycles consisting of 95°C for 15 s, with temperature indicated in Table 1 for 5 s, and 72°C for 10 s. Relative quantification was performed using the comparative threshold (CT) method after determining the CT values for reference and target genes in each sample sets according to the E−ΔΔCt method. Changes in mRNA expression level were calculated after normalization to Rpl0, 18s and Gapdh mRNA.

Animal model study

Experimental Groups

All animal studies were approved by the institutional guidelines and those formulated by the European Community for the Use of Experimental Animals.

Two to three month-old SHO SCID female mice were mated in the animal facility. The presence of a vaginal plug was observed at 0.5 day post coitum (dpc). The gravid mice were randomly assigned to be injected by JEG-3-luc cells (**see flowchart for detailed protocol, Fig. S1**). Six groups of female mice were established: at least eight animals were assigned in each group of the placenta injected mice. Mice in group 1and 2 were injected at 7.5 dpc in two opposed placenta with JEG-3-Sh-CTL (n=15) and JEG-3-Sh-NLRP7 (n=8) respectively. Non-gravid mice in group 3 and 4 were injected in their uterine horns with JEG-3-Sh-CTL (n=7) and JEG-3-Sh-NLRP7 (n=3) respectively. Non-gravid mice in group 5 and 6 were injected in their tail vein with JEG-3-Sh-CTL (n=7) and JEG-3-Sh-NLRP7 (n=7) respectively.

Bioluminescence Imaging

Mice imaging was performed at days 14.5 dpc and 19.5 dpc for gravid mice and up to 34 days post injection (DPI) for non-gravid mice. Bioluminescence imaging was performed with a highly sensitive, cooled CCD camera, mounted in a light-tight specimen box (IVIS®. In Vivo Imaging System. PerkinElmer). Before imaging, animals were anesthetized in 2% isoflurane. 1.5mg/10g of body weight of luciferin (potassium salt, Xenogen, USA) was injected to the mice 15 min before imaging. This dose and route of administration have been shown to be optimal for studies in rodents when images were acquired within 15 min post-luciferin administration. For imaging, mice were placed onto the warmed stage inside the light-tight camera box, with continuous exposure of isoflurane. The animals were imaged and data were acquired for 45 s for mice of group 1 to 4 and 1 min for mice of group 5 and 6. The low levels of light emitted from the bioluminescent tumors were detected by the IVIS® camera system and were then integrated, digitized, and displayed. The regions of interest (ROI) from displayed images were designated around the tumor area and were quantified as total flux of photon/s, using Living Image® software (Xenogen, USA).

After imaging of the whole body of the mouse, a laparotomy was performed to collect blood and to expose and image the uterine horn containing embryos with their attached placentas, as well as the rest of metastatic organs. A second imaging of the organs was performed and quantified as described above. Placentas and metastatic organs were collected and stored at -80°C or collected in PFA for immunohistochemistry analyses.

Immunohistochemistry of mouse tissues

Mouse tissues were processed as previously described {Traboulsi, 2017 #141}. They were incubated with Ki67 antibody, Ki-67 (Dako, France).

Statistical Analysis

Statistical comparisons were made using Mann-Whitney, Student's t-test and one-way ANOVA. All data were checked for normality and equal variance. When normality failed, a nonparametric test followed by Dunn's or Bonferroni's test was used. (SigmaPlot and SigmaStat, Jandel Scientific Software). All data are expressed as means ± SEM ($p < 0.001$, 0.01, and 0.05).

Results

Increased NLRP7 expression in CHM and CC.

We previously showed that NLRP7 is highly expressed in normal human placenta and that its highest level is observed during the first trimester of pregnancy (Abi Nahed, R, 2018, revised). Here, we compared NLRP7 expression in the products of conception from normal first trimester pregnancies (control), CHM and CC, both at the mRNA and protein levels. We also compared the levels of expression of four NLRP7 inflammasome effectors, Caspase1, ASC, IL-1β and IL-18, in the same tissues. **Fig. 1A** shows representative photographs of normal, CHM and CC placental sections stained for NLRP7. NLRP7 protein expression was markedly increased in chorionic villi of CHM (b) as compared to normal pregnancies and was mostly localized to the syncytiotrophoblast layer. CC (c) exhibited stronger staining for NLRP7 as compared to normal (a) and CHM tissues (b). **Fig. 1B** reports comparisons of the levels of NLRP7, Caspase1 and ASC mRNA in control and CHM placental tissues. There was a significant increase in the levels of NLRP7 mRNA in CHM and CC tissues as compared to control tissues, a significant decrease in ASC mRNA, and no change in Caspase1 mRNA. **Fig. 1C** reports comparison of the mRNA expression of IL-1β and IL-18 and shows that both are significantly increased in CHM patients compared to controls.

To get more insights into the status of the NLRP7 effectors in CHM and CC, we compared the circulating levels IL-1β and IL-18 (**Fig. S2A** and **Fig. S2B**). There were significant increases in the levels of both IL-1β and IL-18 in patients with CHM or CC patients as compared to women with normal pregnancies. Further comparisons of other key inflammatory cytokines, such as IL-6, IL-8 and TNFα or anti-inflammatory cytokines such as IL-10 showed that they were all increased in patients with CHM as compared to control women with normal pregnancies, **Fig. S2C.**

NLRP7 expression and regulation in choriocarcinoma cell line, JEG-3

To further study the role of NLRP7 in CC, we used the human choriocarcinoma cell line, JEG-3. First, we compared the levels of NLRP7 as well as all effectors of its inflammasome in a non-tumor trophoblast cell line, HTR, and choriocarcinoma cell line, JEG-3. **Fig. 2A** shows that the amount *Nlrp7* mRNA is 250-fold higher in JEG-3 cells as compared to HTR cells. There were no significant changes in the levels of *Asc* and *Il-18* mRNA. *Caspase 1* mRNA was significantly reduced in JEG-3 and *Il-1β* mRNA was not detected at all in JEG-3.

To substantiate the increase in the levels of NLRP7 expression, we compared its protein levels in HTR and JEG-3 cells. **Fig. 2B** shows significant increases in NLRP7 protein levels in JEG-3 cells compared to HTR cells. The absence of expression of IL-1β in JEG-3 cells was confirmed at the protein level by comparing its secreted levels in HTR and JEG-3 cells with and without stimulation with FSL-1, a bacterial-derived product that activates specifically NLRP7 inflammasome {Khare, 2012 #230}, (**Fig. 2C**). While HTR cells exhibited higher secreted IL-1β levels upon FSL-1 stimulation, JEG-3 cells did not respond to FSL-1 as no secreted or intra-cellular mature IL-1β were detected by ELISA or western blotting in the absence or presence of FSL-1, **Fig. 2D**. These findings suggest that the NLRP7 inflammasome is not active in JEG-3 cells.

Because oxygen tension is a key parameter of normal and tumor placental development, we determined its effects on NLRP7 expression in JEG-3 cells. **Fig. 2** shows the effect of hypoxia on NLRP7 protein expression. There was a significant increase in NLRP7 protein expression under hypoxic conditions, suggesting that NLRP7 is regulated by oxygen tension in JEG-3 cells. Importantly, promoter analysis of the *NLRP7* gene showed the presence of HIF1α (Hypoxia inducible factor) response element, suggesting a direct regulation of NLRP7 by oxygen tension.

Effects of NLRP7 knockdown on the NLRP7 inflammasome machinery in JEG-3 cells

To characterize the role of NLRP7 in JEG-3 cells, we invalidated the transcription of its gene using short hairpin (Sh) strategy. Five ShRNA (#1-5) anti-NLRP7 were developed. **Fig. 3A** compares the NLRP7 protein expression in the five Sh-NLRP7 to the Sh-CTL. Among the five developed Sh-NLRP7, the Sh #1 was the one that exhibited the most significant decrease in NLRP7 protein levels. Hence, Sh #1-NLRP7 was used in all further in vitro and ex vivo experiments. We then compared the levels of NLRP7, ASC, Caspase-1 and IL-18 in JEG-3-Sh-CTL and JEG-3-Sh-NLRP7. **Fig. 3B** demonstrated that JEG3-Sh-NLRP7 exhibited significant decreases in *Nlrp7* mRNA expression with no change in the levels of *ASC*, *Caspase-1* and *Il-18* mRNA levels. Protein analyses of the same actors showed significant decrease in the level of NLRP7, an increase in the level of ASC and no change in the level of caspase1 (**Fig. 3C** and **3D)**.

***NLRP7* knockdown decreased JEG-3 cells proliferation**

One of the key features of gestational choriocarcinoma is the high proliferative rate of trophoblastic cells.

To determine whether *NLRP7* is involved in this process, we compared the proliferation of JEG3-Sh-CTL and JEG3-Sh-NLRP7. **Fig. 4A** reports a comparison of the cells count 24h after their seeding. JEG3-Sh-exhibited a significant decrease in the proliferation rate compared to JEG3-Sh-CTL cells. This effect was confirmed using the Prestoblue® assay, **Fig. 4B.** These finding strongly suggest that NLRP7 is involved in the proliferation of JEG3 cells.

***NLRP7* knockdown increases JEG-3 cell's migration and invasion**

Given the importance of cell migration and invasion in the process of tumor progression and metastasis, we investigated the effect of the *NLRP7* knockdown on JEG-3 migration and invasion. **Fig. 4C** shows representative photographs of JEG3-Sh-CTL and JEG3-Sh-NLRP7 and at (T0h), (T12h) and (T24h) after their wounding. We observed a significant increase in JEG3-Sh-NLRP7 cell migration at 10h after the wounding and this effect was more evident after 24h, **Fig. 4D**. Cell migration was also assessed through the use of filter inserts without any coating. **Fig. 4E-F** showed that knockdown of *NLRP7* increased JEG-3 migration up to 24h. The effect of *NLRP7* knockdown on JEG-3 invasion was tested using the same filter inserts that were pre-coated with matrigel. **Fig. 4G** shows that knockdown of NLRP7 significantly increased JEG-3 invasion. Quantification of the degree of invasion is shown in **Fig. 4H**.

NLRP7 knockdown decreased JEG-3 cell's colony and spheroid formation in 3D culture systems

It was particularly relevant to determine the effect of NLRP7 knockdown on the 3D tumor formation by JEG-3 cells. The 3D structures form topologies similar to the ones observed *in vivo* {Traboulsi, 2017 #141}. Using both the colony formation and the spheroid techniques, we demonstrated that *NLRP7* knockdown decreased the initial processes of tumor formation. **Fig. 5A** and **5B** show that JEG3-Sh-NLRP7 developed less colonies and that their sizes were significantly lower. This effect was substantiated through a follow up of spheroid formation by JEG3-Sh-NLRP7 and JEG3-Sh-CTL during 10 days of culture. **Fig. 5C** shows representative photographs of JEG3-Sh-CTL and JEG3-Sh-NLRP7 forming spheroids at (T 3 days), and (T 10 days). We observed that JEG3-Sh-NLRP7 spheroids exhibited lower diameters and were not as organized as the JEG3-Sh-CTL spheroids. Using time-lapse microscopy, we confirmed that JEG3-Sh-NLRP7 spheroids grow slowly compared to JEG3-Sh-CTL spheroids **Fig. 5D**.

The above clinical and *in vitro* studies strongly suggested that NLRP7 might contribute to the development and growth of CC.

To test this hypothesis, we used our newly developed mouse choriocarcinoma model {Traboulsi, 2017 #141} that mimics CC development and progression in humans. Using this model, we compared the effects of injected JEG3-Sh-CTL or JEG3-Sh-NLRP7 in the placenta of gravid mice on tumor growth and progression. We also determined the effects of NLRP7 knockdown on the growth of CC by injecting JEG3-Sh-CTL or JEG3-Sh-NLRP7 into the uterine horn of non-gravid mice. To compare the aggressiveness of JEG3-Sh-NLRP7 to that of JEG3-Sh-CTL we injected these cells directly in the tail vein of non-gravid mice.

NLRP7 knockdown decreases CC tumor growth *in vivo*

To mimic CC development and progression from its primary site, the placenta, we injected JEG3-Sh-CTL or JEG3-Sh-NLRP7 cells orthotopically within the placenta of SHO-SCID mice at 7.5 dpc. Mice were monitored for tumor development and progression in other organs until 19.5 dpc (see flowchart in **Fig. S1A**). **Fig. 6A**, shows that JEG3-Sh-CTL developed CC as early as 7 days after their injection (**6A.a**) and that the knockdown of *NLRP7* caused a significant decrease in the tumor growth (**6A.b**). At day 19.5 (12 days post injection), we observed an increase in the growth of the CC in the JEG3-Sh-CTL condition (**6A.c**) and a stabilization of the growth of CC upon JEG3-Sh-NLRP7 injection (**6A.c**). Quantification of the growth of these tumors at 14.5 dpc and 19.5 dpc is reported in **Fig. 6B**, **6C** and **6D**. In the two groups we observed important tumor development and metastasis in the uterus and peritoneal fat mass. These metastases were more important in the Sh-CTL as compared to the Sh-NLRP7, **Fig. 6E**. Nevertheless, more occasional metastases in the intestine, mammary glands, spleen and liver were observed in the JEG3-Sh-NLRP7 as compared to JEG3-Sh-CTL. These data strongly suggest that *in vivo* NLRP7 knockdown may contribute to the proliferation and the growth of CC cells to form a tumor. We also observed that gestations of gravid mice injected with JEG3-Sh-CTL was less successful than those injected with JEG3-Sh-NLRP7, as almost 50% of fetuses were resorbed at 19.5dpc in the control condition **Fig6. F**.

***In situ* analyses of placentas collected from JEG3-Sh-CTL mice and from JEG3-Sh-NLRP7 mice.**

Histological comparison of placentas collected from mice injected with JEG3-Sh-CTL or JEG3-Sh-NLRP7 is shown in **Fig 7A**.

Placentas collected from mice injected with JEG3-Sh-CTL exhibited strong histological changes with loss of all placental structures (**Fig. 7Aa, Ab, Ac**), compared to placenta collected from mice injected with JEG3-Sh-NLRP7 (**Fig. 7Ad, Ae, Af**).

To better characterize these changes, we stained the same placentas with an antibody that recognizes human Ki67, a nuclear protein coded by MKI67 and a ubiquitous marker of cellular proliferation. In placentas collected from mice injected with JEG3-Sh-CTL, large areas within the placentas were positively stained with Ki67, confirming the presence of increased number of proliferative JEG3 cells (**Fig 7Ag, Ah, Ai).** Low nuclear staining was observed in placentas collected from mice injected with JEG3-Sh-NLRP7 (**Fig 7Aj, Ak, Al)**. Because peritoneal metastases were often observed in mice injected within their placenta with JEG-3 cells, we analyzed peritoneal fat pads of mice injected by JEG3-Sh-CTL or JEG3-Sh-NLRP7 by both histology and Ki67 staining. **Fig 7Ba and Bb** We found several areas of trophoblastic cells in both the JEG-Sh-CTL and the JEG3-Sh-NLRP7 injected mice, but these areas were much larger with the JEG-Sh-CTL than with the JEG3-Sh-NLRP7 **(Fig 7Bc and Bd).** Ki67 staining confirmed the human origin of these cells (JEG-3) and their proliferative nature **(Fig 7Be and Bf) (Fig 7Bg and Bh).**

NLRP7 knockdown decreased CC tumor growth in the uterine horn.

To further characterize the role of NLRP7 in CC tumor development and growth, we injected JEG3-Sh-CTL and JEG3-Sh-NLRP7 into the uterine horns of non-gravid mice and analyzed tumor formation 7 and 12 days post injection (DPI) (**see flowchart in Fig. S1B**). Similar to the results obtained with the injection of JEG3-Sh-NLRP7 within the placenta, we observed that NLRP7 knockdown significantly inhibited tumor development and growth, **Fig. S3A.** Quantification of tumor growth at 7 and 12 DPI is shown in **Fig. S3B**, and **S3C**, respectively. Importantly, we observed that at 7 DPI tumors were less developed upon JEG3-Sh-CTL or JEG3-Sh-NLRP7 injection in the uterine horn compared to the injection of the same cells and under the same experimental conditions in the placenta, suggesting that the placental environment promotes CC development.

***In situ* analyses of uterus and fat pad collected from JEG3-Sh-CTL mice and from JEG3-Sh-NLRP7 mice.**

Histological comparison of fat pad collected from mice injected with JEG3-Sh-CTL or JEG3-Sh-NLRP7 in the uterus is reported in **Fig S3D**. Again, fat pads collected from mice injected with JEG3-Sh-CTL showed large tumor masses (**Fig. S3Da, Db**) formed by proliferative cells

as illustrated with KI67 staining (**Fig. S3De, Df**). In contrast, fat pads collected from mice injected with JEG3-Sh-NLRP7 showed smaller tumor masses (**Fig. S3Dc, Dd**) and less proliferation (**Fig. S3Dg, Dh**).

Because in this set of experiments tumor cells were injected in the uterine horns, we analyzed the uteri of JEG3-Sh-CTL and JEG3-Sh-NLRP7 injected mice. **Fig S3Ea and Eb** show large tumor masses of trophoblastic cells in the JEG3-Sh-CTL compared to the JEG3-Sh-NLRP7 (**Fig S3Ec and Ed)**. Tumor masses were highly vascularized and often attached to the uterus in the JEG3-Sh-CTL group, while tumor masses were completely embedded within the uterus in the JEG3-Sh-NLRP7 mice. Ki67 staining confirmed the localization of these tumor masses within the uterus in both groups, (**Fig S3Ee and Ef)** (**Fig S3Eg and Eh)**.

NLRP7 knockdown decreased CC cells progression and tropism to the lung.

Because the *in vivo* experiments we conducted in the gravid mice were stopped at the end of the gestation, ie: 12 DPI, we could not observe lung metastases that are frequently found in patients with choriocarcinoma. To determine the role of NLRP7 in the development of lung choriocarcinoma, we injected JEG3-Sh-CTL or JEG3-Sh-NLRP7 into the tail vein of female mice. This method allows tumor cells to rapidly reach the mouse circulation (**see flowchart in Fig. S1C**). All JEG3-Sh-CTL injected mice exhibited lung metastases as the first and unique site of choriocarcinoma development. The knockdown of NLRP7 in JEG-3 cells decreased the tropism of JEG-3 cells to the lungs and tumor growth, **Fig. 8A-C.** Quantification of tumor growth is reported on **Fig. 8D-8E**. These data suggest that high NLRP7 expression promotes CC development within the typical metastatic site of CC.

***In situ* analyses of lungs collected from JEG3-Sh-CTL mice and from JEG3-Sh-NLRP7mice.**

Histological comparison of lungs collected from mice injected with JEG3-Sh-CTL or JEG3-Sh-NLRP7 is reported in **Fig 9**. Lungs collected from mice injected with JEG3-Sh-CTL showed large tumor masses (**Fig. 9a-c**) formed by proliferative cells as illustrated with Ki67 staining (**Fig. 9g-i**). In contrast, tissue collected from mice injected with JEG3-Sh-NLRP7 showed smaller tumor masses (**Fig. 9d-f**) and less proliferative tumor cells as depicted by Ki67 staining (**Fig. 9j-l**).

Discussion

The present work demonstrates the direct involvement of NLRP7 in the development of CC. NLRP7 is the major gene that causes recurrent CHM when mutated on both alleles. However, no studies have addressed its potential involvement in the development of CC. In the present study, we propose that NLRP7 is a key actor in CC growth that should be ranked among important etiological factors of this cancer.

These statements are based on three observations. First, NLRP7 expression is increased in the human CC cells line, the JEG-3, as well as in the placentas from CHM and CC. These results are of great interest in terms of the potential use of this protein as a prognostic biomarker of placental cancer development and/or a new target to treat CC. NLRP7 specificity for the placenta, its control of trophoblast proliferation, and differentiation further support this statement {Mahadevan, 2014 #119;Nguyen, 2014 #137}. Second, NLRP7 is a survival factor for CC cells as it guarantees the increase of their proliferation rate. Although, these results were obtained on JEG-3 cell line, but may also reflect what might occur *in vivo* during CC development, since JEG-3 cell line represent the extravillous trophoblast of a choriocarcinoma. Third, our data demonstrate that NLRP7 contributes to CC growth *in vivo* in three different experimental models.

Since its identification, no study reported a direct association of NLRP7 expression with choriocarcinoma development. Its relationship with cancer has only been reported for two reproductive cancers affecting the testis and the endometrium {Ohno, 2008 #237;Okada, 2004 #238}. In testis cancer, NLRP7 was shown to play a role in cell proliferation {Okada, 2004 #238}. In endometrial cancer, NLRP7 expression was associated with invasiveness and poor patient's prognosis {Ohno, 2008 #237}. Our discovery of NLRP7 association with CC development was predictable since NLRP7 protein exhibits all features that controls key developmental aspects of human placentation, such as trophoblast proliferation and differentiation (R. Abi Nahed, 2018, JMM, revision) {Mahadevan, 2014 #119;Nguyen, 2014 #137}. Under physiological conditions, NLRP7 mediates trophoblast proliferation during the first trimester of pregnancy, as its levels decrease by the time of the establishment of the fetomaternal circulation and placental oxygenation (R. Abi Nahed, 2018, JMM, revision). More importantly, we demonstrated both in normal and tumor trophoblast cells, NLRP7 is upregulated by hypoxia (R. Abi Nahed, 2018, JMM, revision). These findings, suggested a role of NLRP7 in the control of developmental processes that occur during the hypoxic period

of placentation. Hence, NLRP7 overexpression in CC might, in part, be due to the hypoxic environment that accompany their development.

While both our *in vitro* and *in vivo* models demonstrated that NLRP7 is directly involved in CC growth, the *in vitro* study demonstrated that NLRP7 knockdown increased JEG-3 cell's invasion, suggesting that NLRP7 contributes to tumor cell's growth but not metastasis. Nevertheless, in CHM and CC, maintenance of increased NLRP7 levels might contribute to an excessive proliferation rate of trophoblastic cells, a phenomenon that ultimately results in an increased pool of cells acquiring a migratory and invasive phenotype.

The demonstration that NLRP7 knockdown significantly decreased tumor growth suggested that NLRP7 inflammasome is activated in CC cells, yet we did not observe any IL-1β production or secretion by JEG-3 cells, suggesting that the NLRP7 effects exhibit an inflammasome independent pathway in CC cells. This assumption is in a line with previous reports demonstrating that NLRP7 overexpression exerts a negative feedback regulation on IL-1β production, leading to an anti-inflammatory effect {Kinoshita, 2005 #233;Messaed, 2011 #110}. Hence, one can speculate that, while NLRP7 overexpression in CC increases tumor cell proliferation, it may also contribute to the attenuation of its inflammatory status by exerting a negative feedback effect on IL-1β secretion.

The negative feedback loop exerted on the IL-1β production in trophoblast overexpressing NLRP7 may explain the mechanism by which this protein regulates tumor trophoblast proliferation and invasion. Importantly, previous studies reported that IL-1β negatively controls trophoblast proliferation through a direct effect on their cell cycle {Nilkaeo, 2006 #186;Nilkaeo, 2006 #187} and consequently increases their invasion {Prutsch, 2012 #188;Yu, 2015 #189}.

NLRP7 association with the development of CC *in vivo* was established using our newly developed animal model that mimics CC development via JEG-3-luc cells injection within the placenta and confirmed through the use of two other routes, the uterine horn and the tail vein. The three models brought insights into the importance of the CC environment and on its tropism to the lungs. The placental injection route emphasizes the role of this highly vascularized organ for the tumor growth, since mice injected in the uterine horn did not exhibit the same degree of tumor growth. Also, because CC originates from the placenta during its hypoxic developmental period, one can speculate that this environment might promote tumor cell's proliferation. Interestingly, recent data demonstrated that hypoxia generates microenvironments that can have a long-lasting influence on the dissemination of

epithelial cancer cells {Fluegen, 2017 #190;Lehmann, 2017 #191}. The injection of JEG-3 cells in the mouse tail vein confirmed the tropism of CC cells to the lungs and brought evidences that NLRP7 knockdown decreased CC tumor growth in a second organ other than the placenta.

In conclusion, we demonstrated that NLRP7 is highly expressed in CHM and CC patients and that this protein contributes to choriocarcinoma development both *in vitro* and *in vivo*. Altogether these studies shed new light on the status of the most mutated gene in hydatidiform moles and establish its role in the development of gestational choriocarcinoma.

Acknowledgements

We thank Pr N. Samouh (Ibn Rochd Hospital, Casablanca) and Pr F. Golfier, J Massardier, MC Carlier and T Hajri (Centre des maladies gestationelles, Lyon, France) for their collaboration.

Figures legend

Table1: Reports clinical information's about normal pregnant women, patients with complete hydatidiform moles or choriocarcinoma.

Table 2: Reports references of bacterial clones used to generate different cell lines of JEG3-Sh-NLRP7.

Table 3: Repots primers sequences used to perform RT-qPCRs

Figure 1: NLRP7 expression in Control, CHM and CC patients during the first trimester of pregnancy. Panel A reports representative photographs of NLRP7 immunoreactivity (Ir) in placental villous tissues from CTL (**a**), CHM (**b**) and CC (**c**). Cytotrophoblast (Ct), Hobfauer cells (Ho), Extravillous trophoblast (EVT), Syncytiotrophoblast (St). Photograph in (**d**) is a negative control. **Panel B** reports *Nlrp7* mRNA levels in placentas from normal pregnant women (CTL, n=7) and CHM (n=11) during the first trimester of pregnancy (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$; ns: not sognificant). Scale bar = 50 µm.

Figure 2: Differential expression of NLRP7 inflammasome in JEG-3 and HTR8/SV neo cells and its regulation by oxygen tension. Panel A reports a comparison of the mRNA levels of *Nlrp7*, *Asc*, *Caspase 1*, *Il-1β* and *Il-18* expression in HTR-SV/neo and JEG-3 cells (* $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$, ns: non-significant). **Panel B** reports a comparison of NLRP7 protein levels in JEG-3 and HTR8/SV neo cells. **Panel C** reports comparison of IL-1β secreted levels in JEG-3 and HTR8/SV neo cells that were treated or not by FSL-1 (0.1 µg/ml), a microbial acLP agonist for NLRP7. **Panel D** reports a comparison of NLRP7 protein levels in JEG-3 and HTR8/SV neo cells cultured in the absence or presence of FSL-1. **Panel E** reports comparison of NLRP7 protein expression under hypoxic or normoxic conditions in JEG-3 cells. CA9 protein was used to confirm hypoxia. Standardization of protein signals was performed using antibodies against β-actin.

Figure 3: Effects of NLRP7 knockdown on the expression of the components of its inflammasome machinery. Panel A shows a representative western-blot of NLRP7 protein expression in JEG-Sh-CTL and in five different JEG3-Sh-NLRP7 cell lines. β-actin was used to standardize for protein loading. **Panel B** reports a comparison of the mRNA levels of *Nlrp7*, *Asc*, *Caspase 1* and *IL-18* expression in JEG3-Sh-CTL and JEG3-Sh-NLRP7 cells. Three control genes, *RPL0*, *18S* and *GAPDH* were used to standardize for mRNA expression.

The ΔΔCt methodology was used. (*** $p < 0.001$, ns: non-significant; n = 4 per conditions). **Panel C** reports a representative immunoblot that compares NLRP7, ASC, CASPASE 1 protein expression in JEG3-Sh-CTL and JEG3-Sh-NLRP7. **Panel D** reports a quantification of the protein levels of the same proteins in 4 independent experiments. Standardization of protein signals was performed using antibodies against β-actin.

Figure 4: Effect of NLRP7 knockdown on JEG3-Sh-CTL and JEG3-Sh-NLRP7 proliferation and migration. Panel A and B report graphs that summarizes the effect of NLRP7 knockdown on the proliferation JEG-3 cells. Cell proliferation was determined using cells counting (**A**) and Prestoblue® (**B**) techniques. (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, ns: non-significant; n = 5 independent experiments). **Panel C** reports representative images that compare JEG3-Sh-CTL and JEG3-Sh-NLRP7 wound closure at T0h, T12h and T24h. **Panel D** reports kinetics of the wound closure of JEG3-Sh-CT and JEG3-Sh-NLRP7 from T0h to T24h (*** $p < 0.001$; n = 3 independent experiments in dodecaplicats). **Panel E** reports representative images that compare JEG3-Sh-CTL and JEG3-Sh-NLRP7 migration. Cells were pre-labelled with DiI-Ac-LDL (red color; a lipophilic membrane stain that diffuses laterally to stain the entire cell). **Panel F** reports a quantification of the migration rate of the two cell types collected from 3 independent experiments (** $p < 0.01$). **Panel G** reports representative images that compare JEG3-Sh-CTL and JEG3-Sh-NLRP7 invasion. Cells were pre-labelled with DiI-Ac-LDL (red color) and plated on matrigel. **Panel H** reports a quantification of the invasion rate of the two cell types collected from 3 independent experiments (* $p < 0.05$).

Figure 5: Effect of NLRP7 knockdown on JEG3-Sh-CTL and JEG3-Sh-NLRP7 colony and spheroid formation in 3D culture systems. Panel A reports the quantification of the number of colony formation per field by JEG3-Sh-CTL and JEG3-Sh-NLRP7 (*** $p < 0.001$). **Panel B** reports a graph that compares the average sizes of the colonies formed by JEG3-Sh-CTL and JEG3-Sh-NLRP7 (*** $p < 0.001$). **Panel C** reports representative images that compare JEG3-Sh-CTL and JEG3-Sh-NLRP7 spheroid formation at day 3 after their seeding, and 10 days post culture. The scale bar is 400 µm. **Panel D** reports kinetics that compares changes in the spheroids diameter of JEG3-Sh-CTL and JEG3-Sh-NLRP7 from day 3 to day 10 of culture. (n = 3 experiments in hexaplicats; ** $p < 0.01$).

Figure 6: Bioluminescence images of gravid SHO-SCID mice injected in the placenta with JEG3-Sh-CTL and JEG3-Sh-NLRP7 at day 14.5 and 19.5 of gestation. **Panel A** shows representative images of gravid mice injected by JEG3-Sh-CTL (Aa, Ab) or JEG3-Sh-NLRP7 (Ac, Ad), respectively. **Panel B** and **Panel C** report quantification of the mean photon flux (p/sec) for JEG3-Sh-CTL injected mice (n=15) and JEG3-Sh-NLRP7 (n=8) at 14.5 (7 days post injection) and 19.5 days of gestation (12 days post injection), respectively. Data are presented as box plots (** $p < 0.01$). **Panel D** illustrates tumor growth in JEG3-Sh-CTL and in JEG3-Sh-NLRP7 mice from 7 days to 12 days post injection. **Panel E** reports comparisons of the photon flux in the uterus and the peritoneal mass of the JEG3-Sh-CTL and in JEG3-Sh-NLRP7 mice sacrificed at day 19.5 of gestation (* $p < 0.05$, ns: not significant). **Panel F** compares the percentages of resorbed fetuses in JEG3-Sh-CTL and in JEG3-Sh-NLRP7 mice at day 19.5 of gestation (ns: not significant).

Figure 7: Histological characterization of placentas and fat pad collected from mice injected with JEG3-Sh-CTL or JEG3-Sh-NLRP7 within their placentas**. Panel A** reports the histology and the Ki67 staining of placentas collected from, JEG3-Sh-CTL or JEG3-Sh-NLRP7. Photographs in **a-c (c is a higher magnification of b and b is a higher magnification of a)** report histology of placentas collected from mice that were injected with JEG3-Sh-CTL. Photographs in **g-i (increased magnifications)** report Ki67 staining in the same placentas. Photographs in **d-f (increased magnifications)** report histology of placentas collected from mice that were injected with JEG3-Sh-NLRP7. Photographs in **j-l (increased magnifications)** report Ki67 staining in the same placentas. **Panel B** reports the histology and the Ki67 staining of fat pads collected from, JEG3-Sh-CTL or JEG3-Sh-NLRP7. Photographs in **a-b (increased magnification)** report histology of fat pad collected from mice that were injected with JEG3-Sh-CTL. Photographs in **e-f (increased magnifications)** report Ki67 staining in the same tissues. Photographs in **c-d (increased magnifications)** report histology of fat pads collected from mice that were injected with JEG3-Sh-NLRP7. Photographs in **g-h (increased magnifications)** report Ki67 staining in the same tissues. TC: tumor cells, JZ: junctional zone. Scale bar = 100µm.

Figure 8: Bioluminescence images of SHO-SCID mice injected in the tail vein with JEG3-Sh-CTL or JEG3-Sh-NLRP7. **Panel A** shows representative images of female mice injected with JEG3-Sh-CTL (Aa-g) n=7 or JEG3-Sh-NLRP7 (Ah-n) n=7 at day 34 post injections, respectively.

Panel B compares tumor lung growth in JEG3-Sh-CTL and in JEG3-Sh-NLRP7 from 14 post injection to day 34 post injection. **Panel C** reports the kinetic the growth of JEG3-Sh-NLRP7 tumor at its actual scale. **Panel D** reports images of lungs collected from JEG3-Sh-CTL injected mice (Da-g) and of lungs collected from JEG3-Sh-NLRP7 injected mice (Dh-n). **Panel E** reports a graph that compares the mean total flux of lungs collected from JEG3-Sh-CTL and JEG3-Sh-NLRP7 injected mice (* $p < 0.05$).

Figure 9: Histological characterization of the lung tissues collected from mice injected with JEG3-Sh-CTL or JEG3-Sh-NLRP7 into the tail vein. This figure reports the histology and the Ki67 staining of lungs collected from, JEG3-Sh-CTL or JEG3-Sh-NLRP7. Photographs in **a-c (c is a higher magnification of b and b is a higher magnification of a)** report histology of lungs collected from mice that were injected with JEG3-Sh-CTL. Photographs in **g-i (increased magnifications)** report Ki67 staining in the same lung tissue sections. Photographs in **d-f (increased magnifications)** report histology of lungs collected from mice that were injected with JEG3-Sh-NLRP7. Photographs in **j-l (increased magnifications)** report Ki67 staining in the same lung tissues. Scale bar = 100µm.

Supplemental figure legends

Figure S1: Experimental procedure for the *in vivo* study. Panel A illustrates the flow chart of the experimental procedure performed at different time-points during the study using mice injected in the placenta. The gravid mice were randomly assigned to be injected on day 7.5 of gestation either with JEG3-Sh-CTL (n=15) or in JEG3-Sh-NLRP7 (n=8). Mice were imaged at day 14.5 and 19.5 of gestation using IVIS imaging system and sacrificed at 19.5dpc. Placenta, metastatic tissues and maternal blood were collected after imaging. **Panel B** illustrates the flow chart of the experimental procedure used for mice injected in the horns. The mice were randomly assigned to be injected either with JEG3-Sh-CTL (n=3) or in JEG3-Sh-NLRP7 (n=3). Mice were imaged at 7 and 12 days post injection using IVIS imaging system and sacrificed 12 days post injection. Tissues and blood were collected after imaging. **Panel C** illustrates the flow chart of the experimental procedure used for mice injected in the tail vein**.** The mice were randomly assigned to be injected either with JEG3-Sh-CTL (n=7) or in JEG3-Sh-NLRP7 (n=7). Mice were imaged at 7 and 14, 21 and 28 and 34 days post injection using IVIS imaging system and sacrificed 34 days post injection. Tissues and blood were collected after imaging.

Figure S2: **Characterization of the inflammatory status of normal pregnant women, CHM and CC patients. Panel A** reports IL-1β circulating levels in normal pregnant women (CTL, n=9); CHM (n=12) and CC patients (n=9) during the first trimester of pregnancy (*p< 0.05, ns: non-significant). **Panel B** reports a graph that compares the levels of IL-18 in the same cohorts. **Panel C** reports a graph that compares the levels of IL-6, IL-8, IL-10 and TNFα levels in CTL (n=6) and CHM (n=20) patients. Data are represented as box plots (*p< 0.05, **p< 0.01).

Figure S3: Bioluminescence images of SHO-SCID mice injected in the horns with JEG3-Sh-CTL or JEG3-Sh-NLRP7. **Panels A** shows representative images of female mice injected by JEG3-Sh-CTL (Aa, Ab) or JEG3-Sh-NLRP7 (Ac, Ad) at day 7 and day 12 post injection, respectively. **Panel B** and **Panel C** report quantification of the values of total photon flux (p/sec) for JEG3-Sh-CTL injected mice (n=3) and JEG3-Sh-NLRP7 (n=3) at day 7 and day 12 post injections, respectively. (* p<0.05, ns: not significant). **Panel D** shows the histological characterization of the uterus collected from mice injected with JEG3-Sh-CTL or JEG3-Sh-NLRP7 within their uterine horns. Photographs in **Da-b** (**b is a higher magnification of a**) report histology of uterine tissue collected from mice that were injected with JEG3-Sh-CTL. Photographs in **e-f** (**increased magnifications**) report Ki67 staining in the same tissues. Photographs in **c-d** (**increased magnifications**) report histology of uterine tissues collected from mice that were injected with JEG3-Sh-NLRP7. Photographs in **g-h** (**increased magnifications**) report Ki67 staining in the same tissues. **Panel E** shows the histological characterization of the fat pads collected from mice injected with JEG3-Sh-CTL or JEG3-Sh-NLRP7 within their uterine horns. Photographs in **E a-b** (**b is a higher magnification of a**) report histology of fat pad tissue collected from mice that were injected with JEG3-Sh-CTL. Photographs in **e-f** (**increased magnifications**) report Ki67 staining in the same tissues. Photographs in **c-d** (**increased magnifications**) report histology of fat pad tissues collected from mice that were injected with JEG3-Sh-NLRP7. Photographs in **g-h** (**increased magnifications**) report Ki67 staining in the same tissues. Scale bar = 100μm.

References

1. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. Journal of leukocyte biology **2007**;81:1-5
2. Chen GY, Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. Nature reviews Immunology **2010**;10:826-37
3. Kufer TA, Sansonetti PJ. NLR functions beyond pathogen recognition. Nature immunology **2011**;12:121-8
4. Kim YK, Shin JS, Nahm MH. NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases. Yonsei medical journal **2016**;57:5-14
5. Davis BK, Wen H, Ting JP. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. Annual review of immunology **2011**;29:707-35
6. Kinoshita T, Wang Y, Hasegawa M, Imamura R, Suda T. PYPAF3, a PYRIN-containing APAF-1-like protein, is a feedback regulator of caspase-1-dependent interleukin-1beta secretion. The Journal of biological chemistry **2005**;280:21720-5
7. Messaed C, Akoury E, Djuric U, Zeng J, Saleh M, Gilbert L*, et al.* NLRP7, a nucleotide oligomerization domain-like receptor protein, is required for normal cytokine secretion and co-localizes with Golgi and the microtubule-organizing center. The Journal of biological chemistry **2011**;286:43313-23
8. Murdoch S, Djuric U, Mazhar B, Seoud M, Khan R, Kuick R*, et al.* Mutations in NALP7 cause recurrent hydatidiform moles and reproductive wastage in humans. Nature genetics **2006**;38:300-2
9. Froeling FE, Seckl MJ. Gestational trophoblastic tumours: an update for 2014. Current oncology reports **2014**;16:408
10. Stevens FT, Katzorke N, Tempfer C, Kreimer U, Bizjak GI, Fleisch MC*, et al.* Gestational Trophoblastic Disorders: An Update in 2015. Geburtshilfe und Frauenheilkunde **2015**;75:1043-50
11. Radian AD, de Almeida L, Dorfleutner A, Stehlik C. NLRP7 and related inflammasome activating pattern recognition receptors and their function in host defense and disease. Microbes and infection **2013**;15:630-9
12. Boufettal H, Khalkane L, Noun M, Hermas S, Samouh N. Gestational choriocarcinoma at Ibn Rochd Hospital, Casablanca, 2004-2010. East Mediterr Health J **2014**;19 Suppl 3:S208-12
13. Cisse CT, Lo N, Moreau JC, Fall-Gaye C, Mendez V, Diadhiou F. [Choriocarcinoma in Senegal: epidemiology, prognosis and prevention]. Gynecologie, obstetrique & fertilite **2002**;30:862-9
14. Altieri A, Franceschi S, Ferlay J, Smith J, La Vecchia C. Epidemiology and aetiology of gestational trophoblastic diseases. The Lancet Oncology **2003**;4:670-8
15. Smith HO. Gestational trophoblastic disease epidemiology and trends. Clinical obstetrics and gynecology **2003**;46:541-56
16. Savage P, Kelpanides I, Tuthill M, Short D, Seckl MJ. Brain metastases in gestational trophoblast neoplasia: an update on incidence, management and outcome. Gynecologic oncology **2015**;137:73-6
17. Grummer R, Donner A, Winterhager E. Characteristic growth of human choriocarcinoma xenografts in nude mice. Placenta **1999**;20:547-53
18. Ohno S, Kinoshita T, Ohno Y, Minamoto T, Suzuki N, Inoue M*, et al.* Expression of NLRP7 (PYPAF3, NALP7) protein in endometrial cancer tissues. Anticancer research **2008**;28:2493-7
19. Okada K, Hirota E, Mizutani Y, Fujioka T, Shuin T, Miki T*, et al.* Oncogenic role of NALP7 in testicular seminomas. Cancer science **2004**;95:949-54

20. Kohler PO, Bridson WE. Isolation of hormone-producing clonal lines of human choriocarcinoma. The Journal of clinical endocrinology and metabolism **1971**;32:683-7
21. Brouillet S, Murthi P, Hoffmann P, Salomon A, Sergent F, De Mazancourt P*, et al.* EG-VEGF controls placental growth and survival in normal and pathological pregnancies: case of fetal growth restriction (FGR). Cell Mol Life Sci **2013**;70:511-25
22. Traboulsi W, Sergent F, Boufettal H, Brouillet S, Slim R, Hoffmann P*, et al.* Antagonism of EG-VEGF Receptors as Targeted Therapy for Choriocarcinoma Progression In Vitro and In Vivo. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research **2017**;23:7130-40
23. Khare S, Dorfleutner A, Bryan NB, Yun C, Radian AD, de Almeida L*, et al.* An NLRP7-containing inflammasome mediates recognition of microbial lipopeptides in human macrophages. Immunity **2012**;36:464-76
24. Mahadevan S, Wen S, Wan YW, Peng HH, Otta S, Liu Z*, et al.* NLRP7 affects trophoblast lineage differentiation, binds to overexpressed YY1 and alters CpG methylation. Human molecular genetics **2014**;23:706-16
25. Nguyen NM, Zhang L, Reddy R, Dery C, Arseneau J, Cheung A*, et al.* Comprehensive genotype-phenotype correlations between NLRP7 mutations and the balance between embryonic tissue differentiation and trophoblastic proliferation. Journal of medical genetics **2014**;51:623-34
26. Nilkaeo A, Bhuvanath S. Interleukin-1 modulation of human placental trophoblast proliferation. Mediators of inflammation **2006**;2006:79359
27. Nilkaeo A, Bhuvanath S, Praputbut S, Wisessombat S. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in JAR trophoblast by antimalarial drugs. Biomedical research **2006**;27:131-7
28. Prutsch N, Fock V, Haslinger P, Haider S, Fiala C, Pollheimer J*, et al.* The role of interleukin-1beta in human trophoblast motility. Placenta **2012**;33:696-703
29. Yu N, Yan W, Yin T, Wang Y, Guo Y, Zhou D*, et al.* HCG-Activated Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) Promote Trophoblast Cell Invasion. PloS one **2015**;10:e0125589
30. Fluegen G, Avivar-Valderas A, Wang Y, Padgen MR, Williams JK, Nobre AR*, et al.* Phenotypic heterogeneity of disseminated tumour cells is preset by primary tumour hypoxic microenvironments. Nature cell biology **2017**;19:120-32
31. Lehmann S, Te Boekhorst V, Odenthal J, Bianchi R, van Helvert S, Ikenberg K*, et al.* Hypoxia Induces a HIF-1-Dependent Transition from Collective-to-Amoeboid Dissemination in Epithelial Cancer Cells. Current biology : CB **2017**;27:392-400

Figure 1

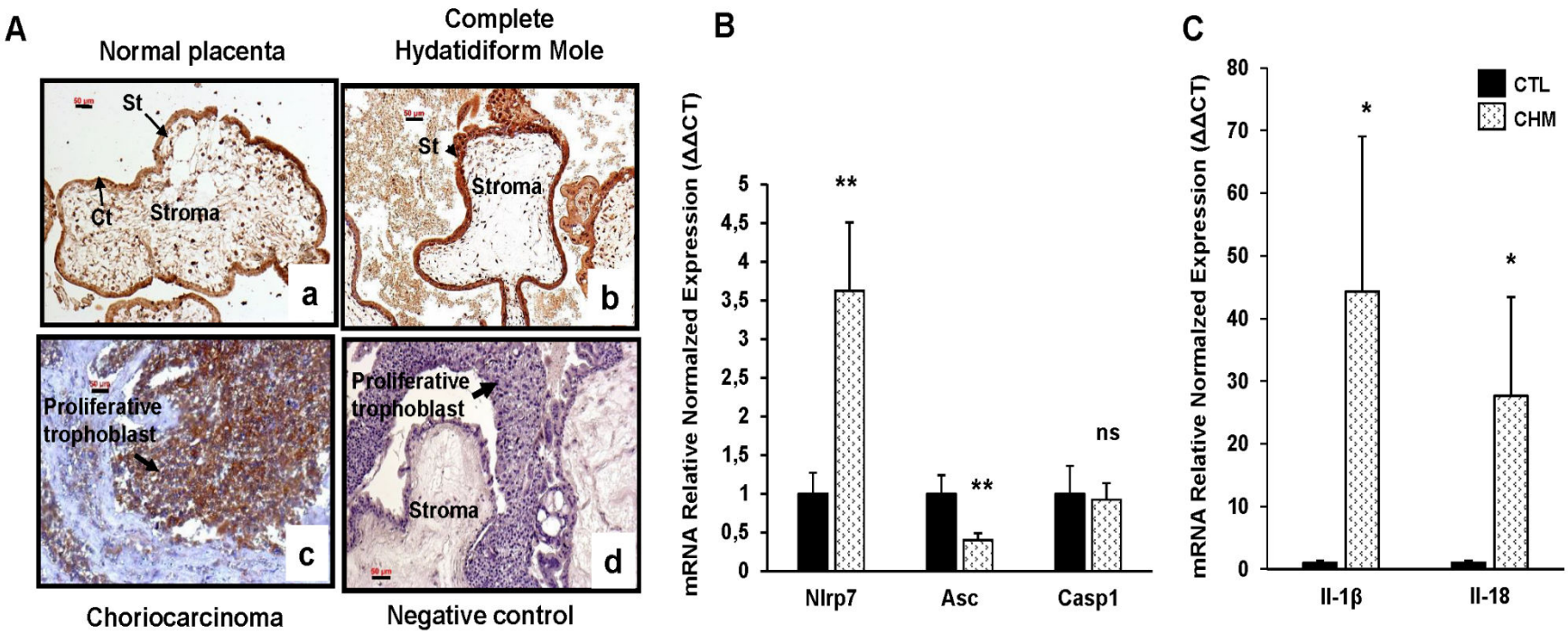

A
Normal placenta
Complete Hydatidiform Mole
St
Ct
Stroma
a
St
Stroma
b
Proliferative trophoblast
c
Proliferative trophoblast
Stroma
d
Choriocarcinoma
Negative control
B
mRNA Relative Normalzed Expression (ΔΔCT)
5
4,5
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
**
**
ns
Nlrp7
Asc
Casp1
C
mRNA Relative Normalzed Expression (ΔΔCT)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
CTL
CHM
*
*
Il-1β
Il-18

Figure 2

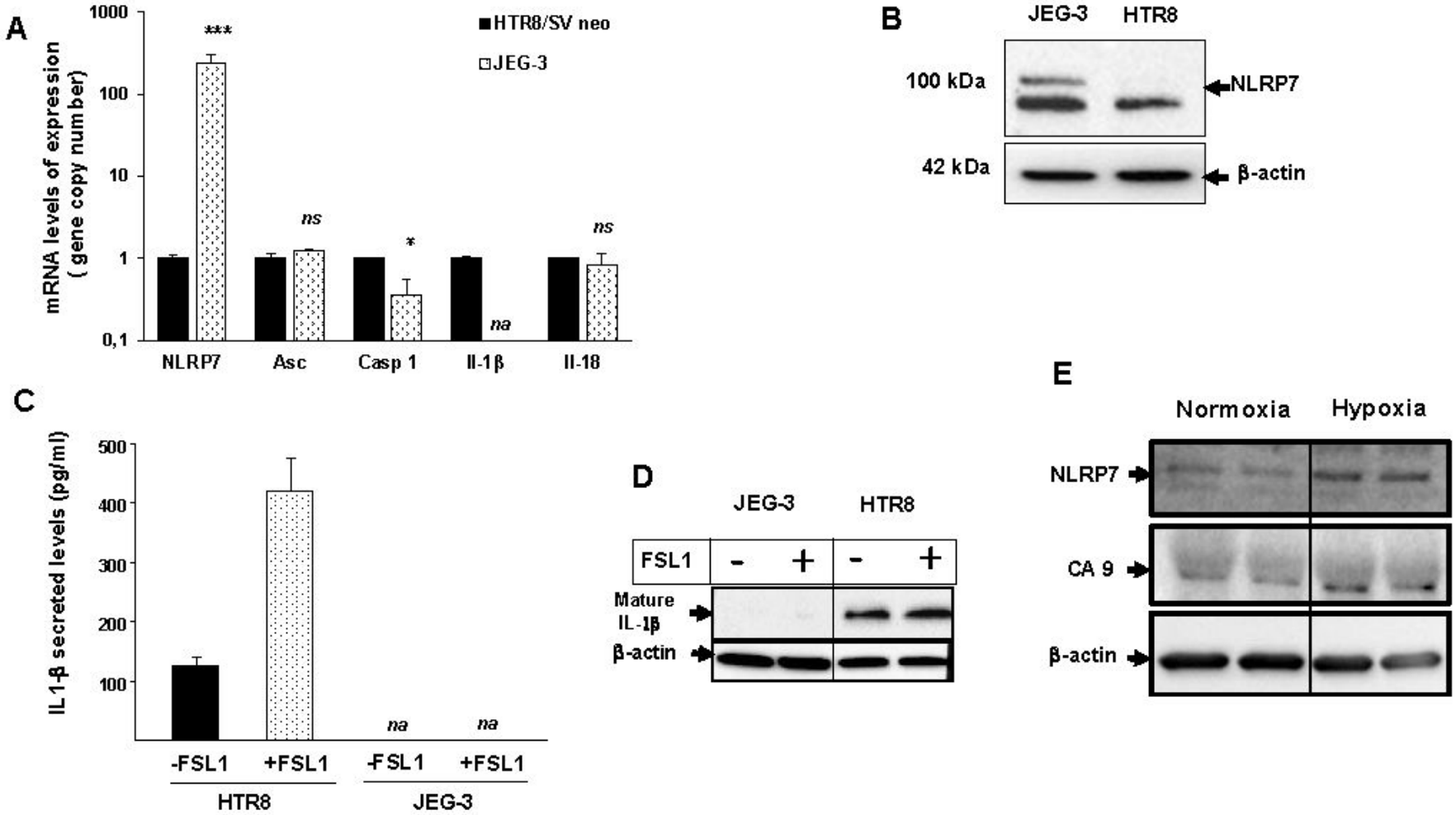
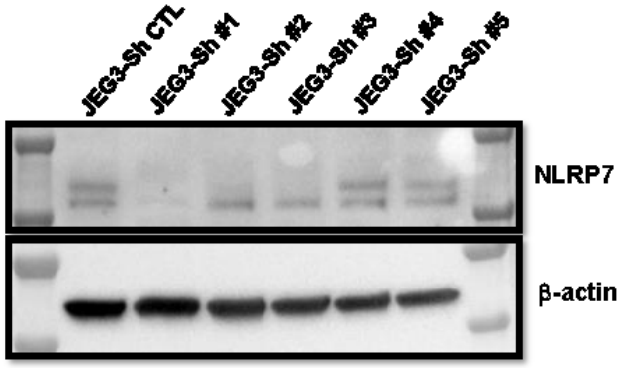
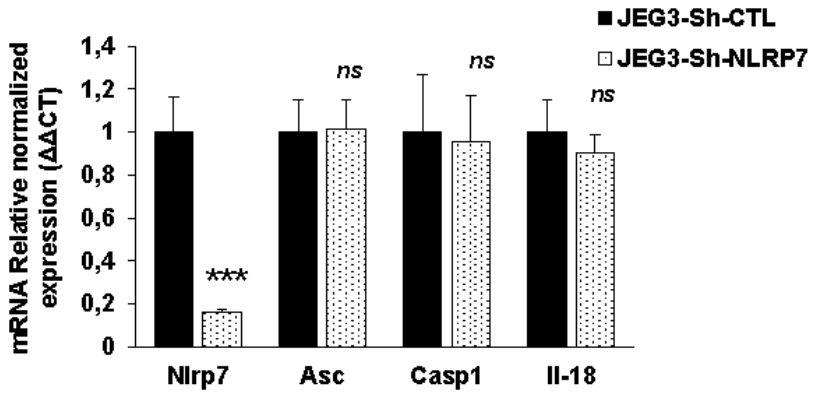

A
mRNA levels of expression (gene copy number)
1000
100
10
1
0,1
***
ns
*
na
ns
HTR8/SV neo
JEG-3
NLRP7
Asc
Casp 1
Il-1β
Il-18
B
JEG-3
HTR8
100 kDa
42 kDa
NLRP7
β-actin
C
IL 1-β secreted levels (pg/ml)
500
400
300
200
100
na
na
-FSL1
+FSL1
-FSL1
+FSL1
HTR8
JEG-3
D
JEG-3
HTR8
FSL1
-
+
-
+
Mature IL-1β
β-actin
E
Normoxia
Hypoxia
NLRP7
CA 9
β-actin

Figure 3

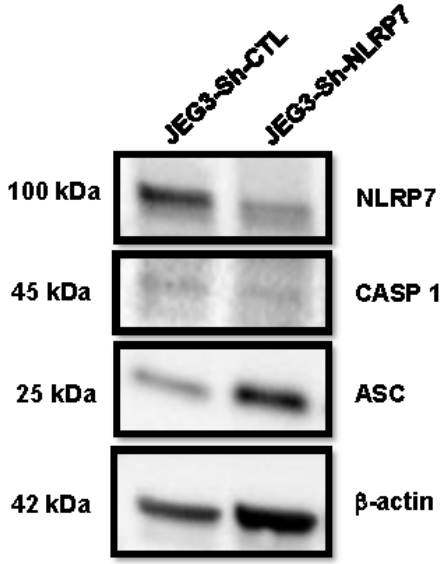
A



B



C



D

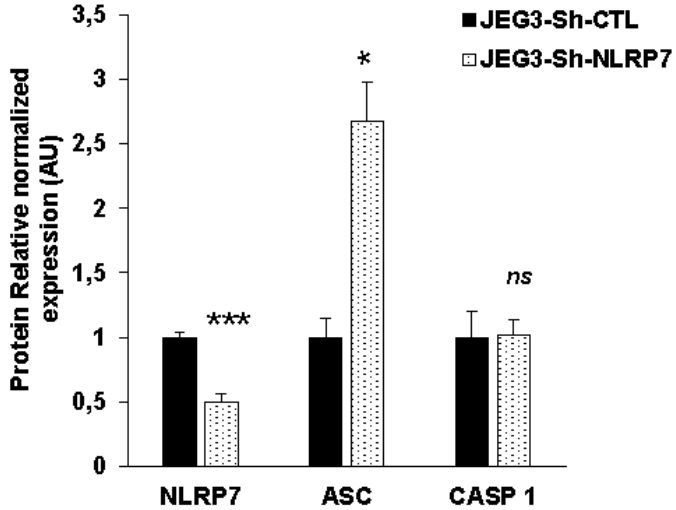


Figure 4

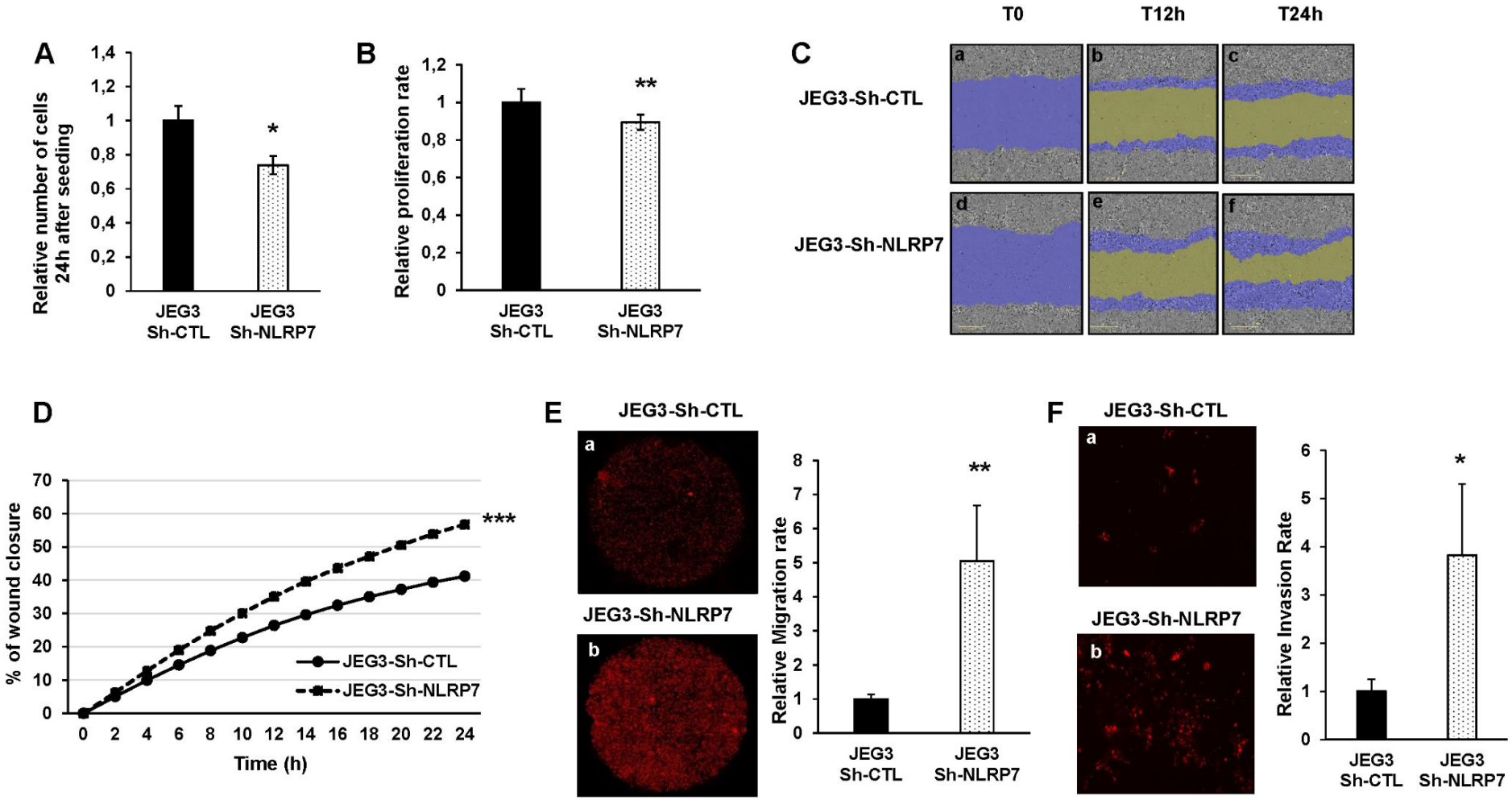
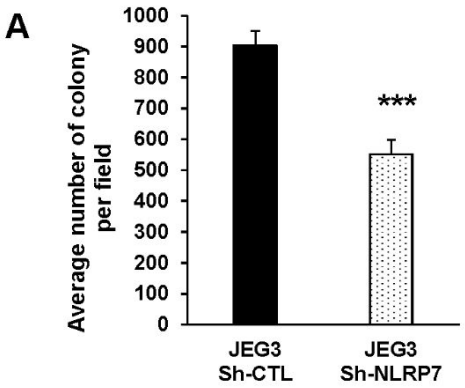
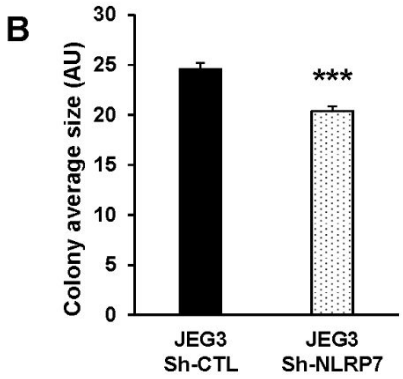
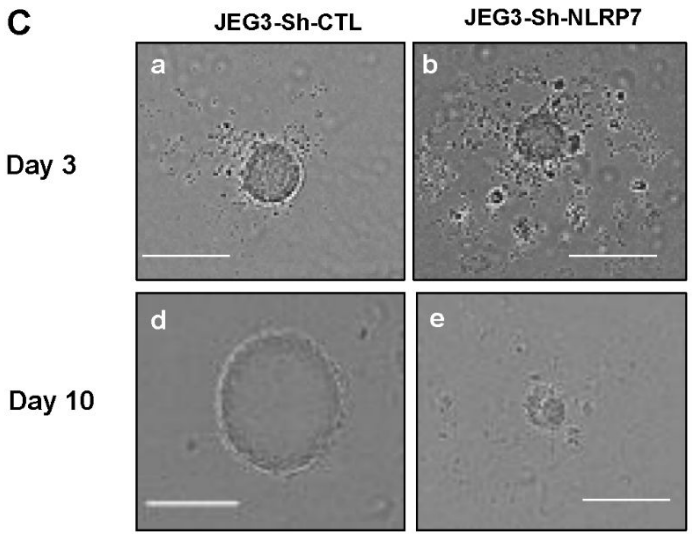

A
Relative number of cells 24h after seeding
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
*
JEG3 Sh-CTL
JEG3 Sh-NLRP7
B
Relative proliferation rate
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
**
JEG3 Sh-CTL
JEG3 Sh-NLRP7
C
T0
T12h
T24h
JEG3-Sh-CTL
JEG3-Sh-NLRP7
a
b
c
d
e
f
D
% of wound closure
70
60
50
40
30
20
10
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24
Time (h)
***
JEG3-Sh-CTL
JEG3-Sh-NLRP7
E
JEG3-Sh-CTL
a
JEG3-Sh-NLRP7
b
Relative Migration rate
8
7
6
5
4
3
2
1
0
**
JEG3 Sh-CTL
JEG3 Sh-NLRP7
F
JEG3-Sh-CTL
a
JEG3-Sh-NLRP7
b
Relative Invasion Rate
6
5
4
3
2
1
0
*
JEG3 Sh-CTL
JEG3 Sh-NLRP7

Figure 5


A
Average number of colony per field
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
***
JEG3 Sh-CTL
JEG3 Sh-NLRP7


B
Colony average size (AU)
30
25
20
15
10
5
0
***
JEG3 Sh-CTL
JEG3 Sh-NLRP7


C
JEG3-Sh-CTL
JEG3-Sh-NLRP7
Day 3
Day 10
a
b
d
e

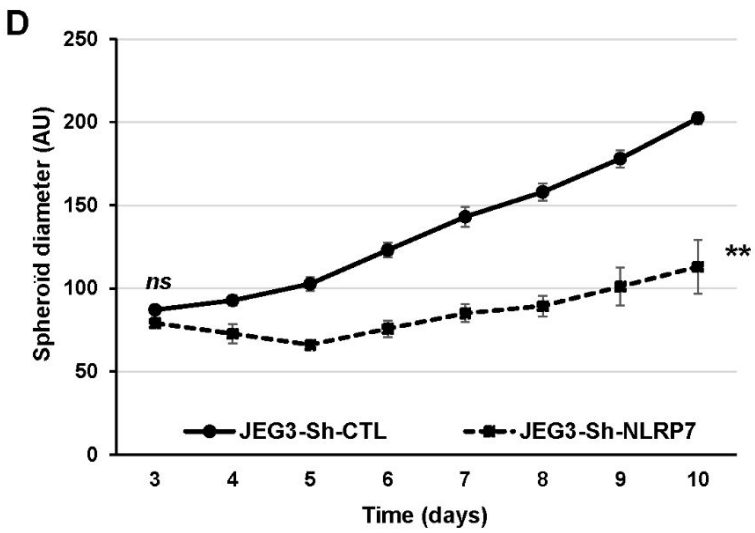

D
Spheroid diameter (AU)
250
200
150
100
50
0
ns
**
JEG3-Sh-CTL
JEG3-Sh-NLRP7
3
4
5
6
7
8
9
10
Time (days)

Figure 6

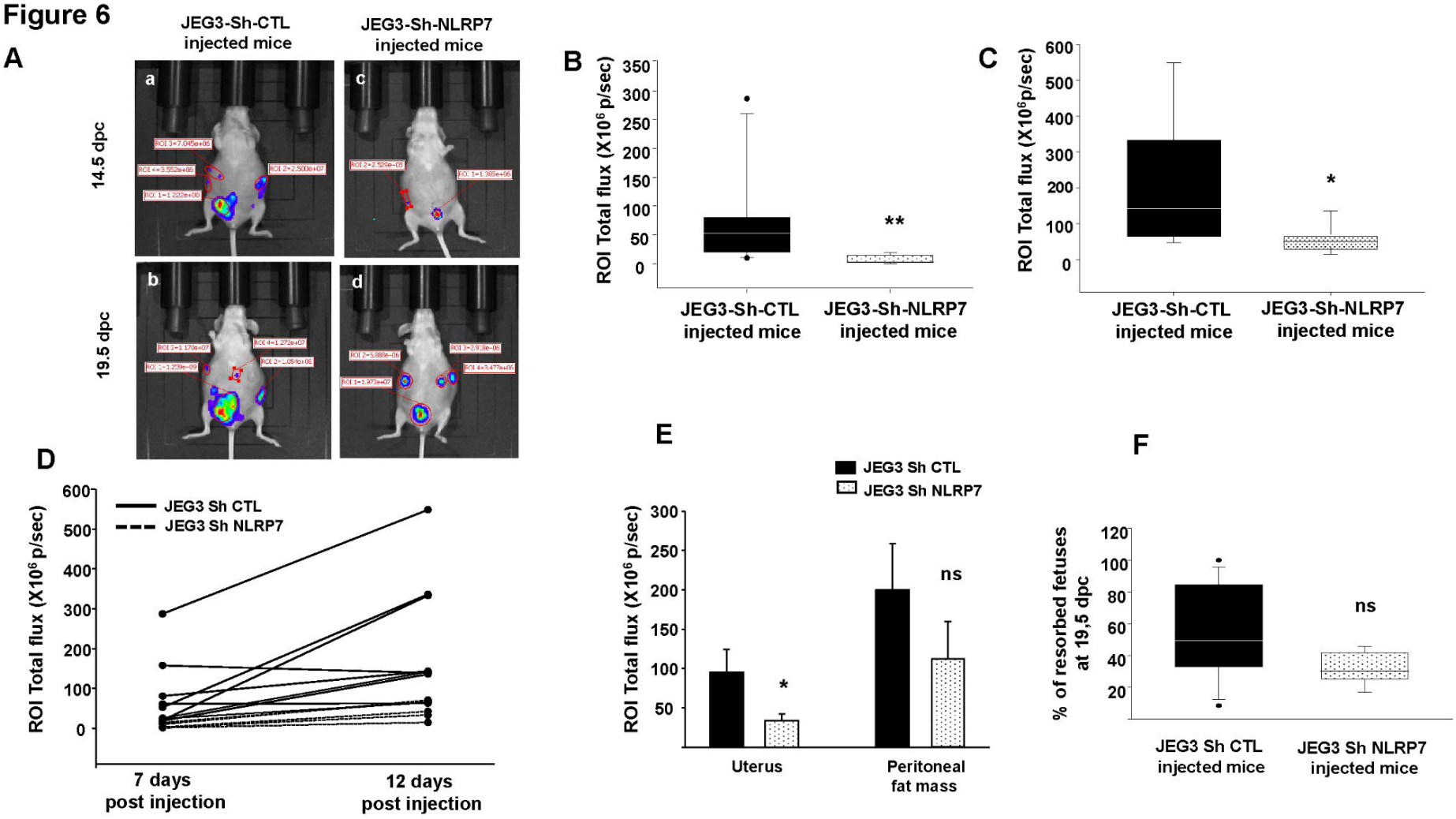

A
JEG3-Sh-CTL injected mice
JEG3-Sh-NLRP7 injected mice
14.5 dpc
19.5 dpc
a
b
c
d
B
ROI Total flux (X10^6 p/sec)
JEG3-Sh-CTL injected mice
JEG3-Sh-NLRP7 injected mice
**
C
ROI Total flux (X10^6 p/sec)
JEG3-Sh-CTL injected mice
JEG3-Sh-NLRP7 injected mice
*
D
ROI Total flux (X10^6 p/sec)
JEG3 Sh CTL
JEG3 Sh NLRP7
7 days post injection
12 days post injection
E
JEG3 Sh CTL
JEG3 Sh NLRP7
ROI Total flux (X10^6 p/sec)
Uterus
Peritoneal fat mass
*
ns
F
% of resorbed fetuses at 19,5 dpc
JEG3 Sh CTL injected mice
JEG3 Sh NLRP7 injected mice
ns

Figure 7

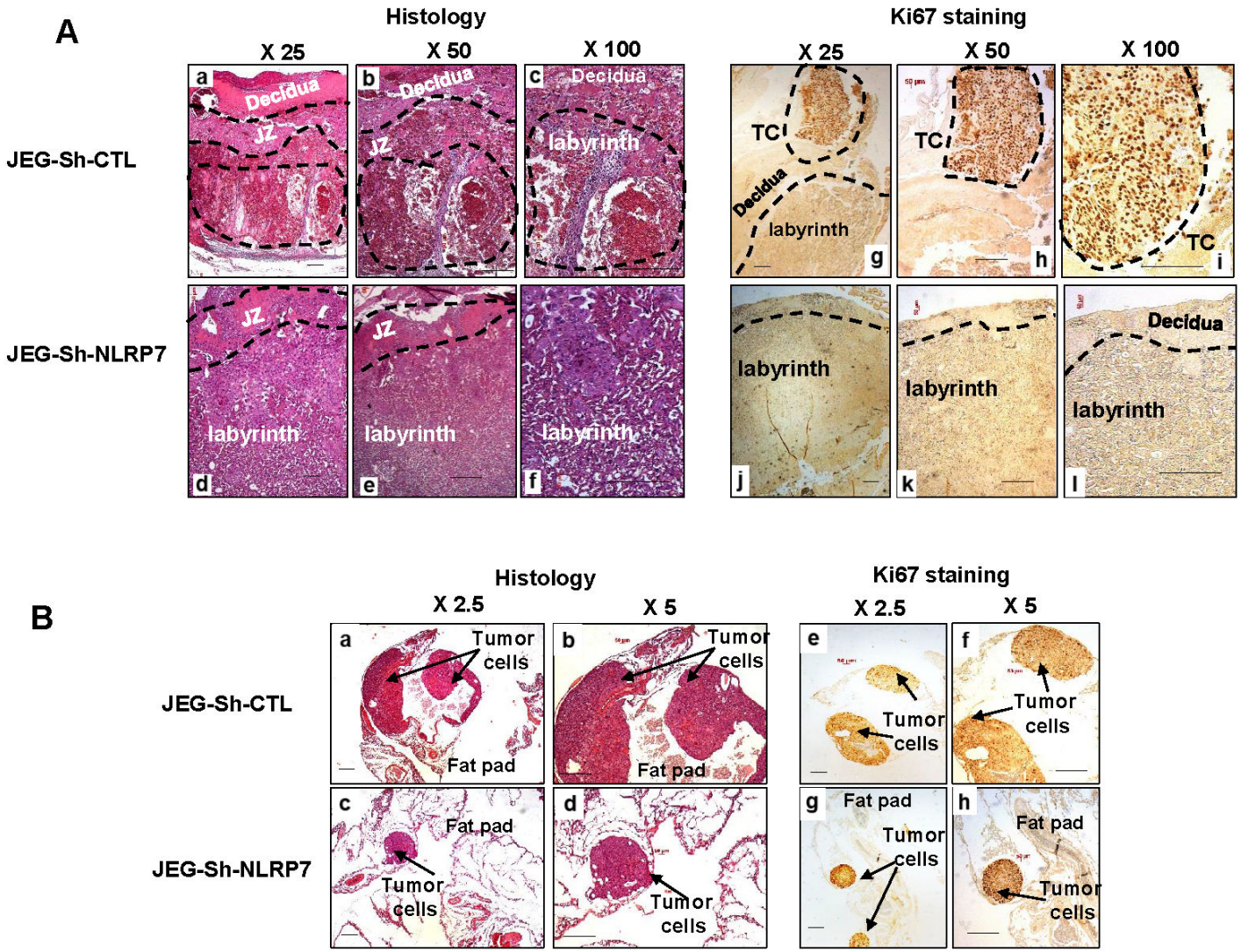

A
Histology
Ki67 staining
X 25
X 50
X 100
JEG-Sh-CTL
JEG-Sh-NLRP7
Decidua
JZ
labyrinth
TC
a
b
c
d
e
f
g
h
i
j
k
l
B
X 2.5
X 5
Tumor cells
Fat pad

Figure 8

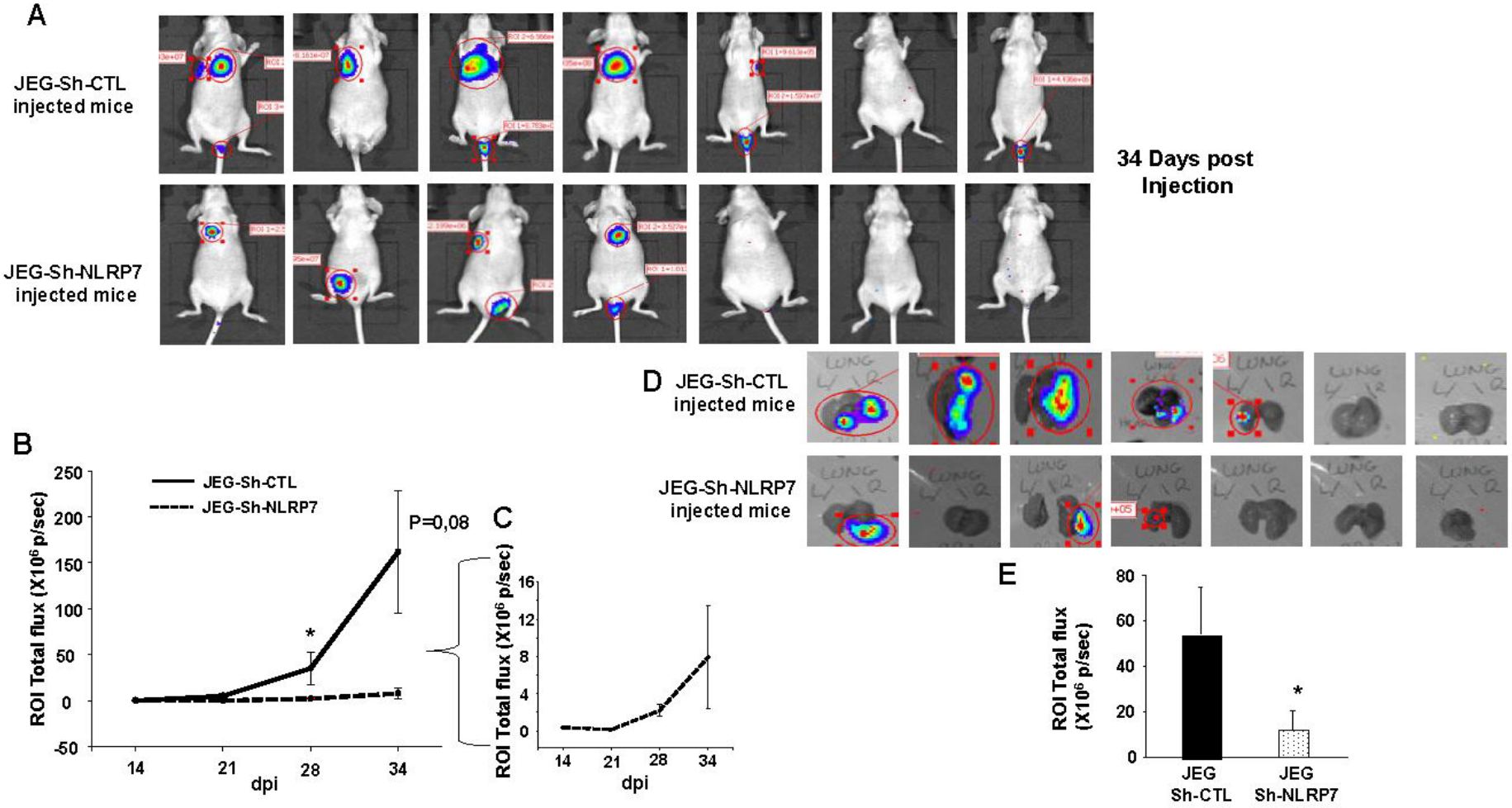

A
JEG-Sh-CTL injected mice
JEG-Sh-NLRP7 injected mice
34 Days post Injection
B
JEG-Sh-CTL
JEG-Sh-NLRP7
P=0,08
*
ROI Total flux (X10^6 p/sec)
250
200
150
100
50
0
-50
14
21
28
34
dpi
C
ROI Total flux (X10^6 p/sec)
16
12
8
4
0
14
21
28
34
dpi
D
JEG-Sh-CTL injected mice
JEG-Sh-NLRP7 injected mice
E
ROI Total flux (X10^6 p/sec)
80
60
40
20
0
*
JEG Sh-CTL
JEG Sh-NLRP7

Figure 9

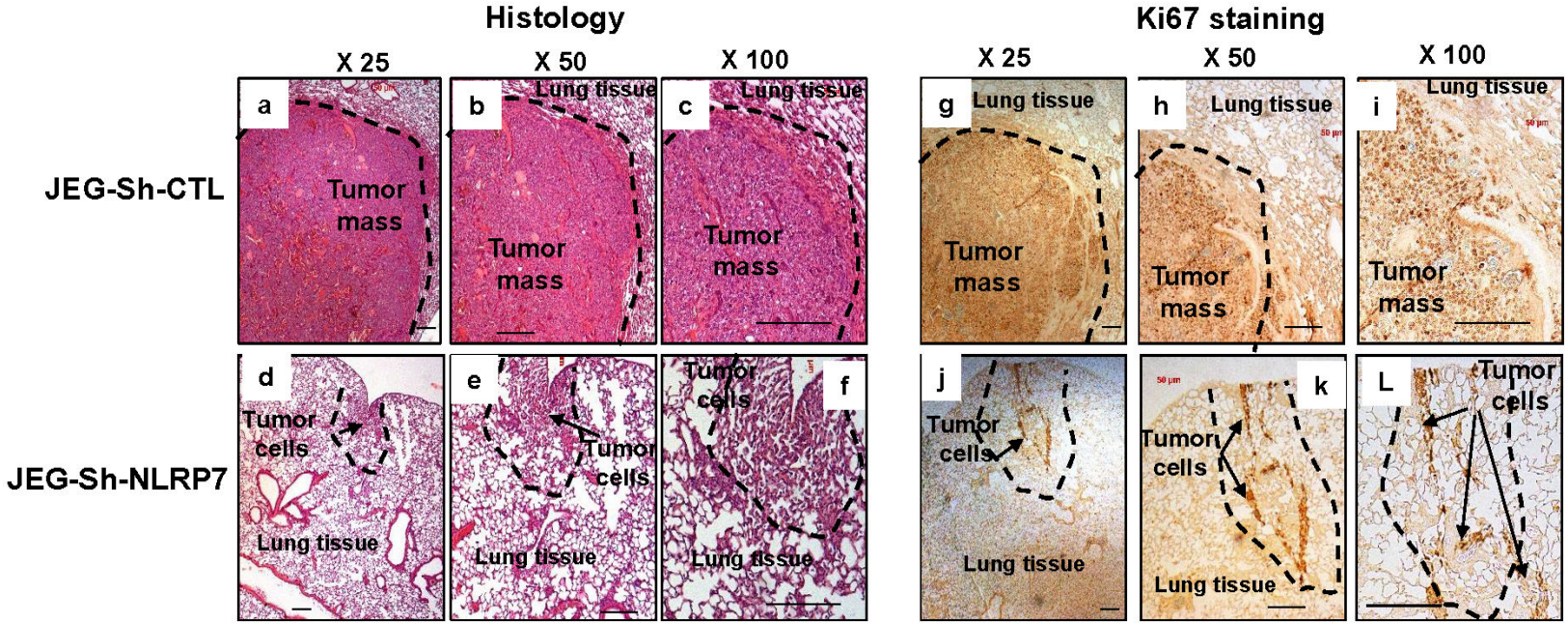

Histology
Ki67 staining
X 25
X 50
X 100
X 25
X 50
X 100
JEG-Sh-CTL
JEG-Sh-NLRP7
a
b
c
d
e
f
g
h
i
j
k
L
Tumor mass
Lung tissue
Tumor cells

Table 1

Clinical characteristics of normal and pathological pregnancies

Maternal characteristics	Normal Gestations (n=20)	Hydatidiform Mole (n=38)	Choriocarcinoma (n=9)
Maternal age (years)	24.8 (18-30)	31.2 (19-50)	36.7 (21-45)
Gestational age at sampling (weeks)	12-14	12-14	6-21
βhCG at sampling (mUI/mL)	9052 (± 1950)	5487- 242400	15950-439212
Menarche (years)	13 (± 1.0)	14.1 (± 1.7)	11.66 (± 0.33)
Age of first pregnancy (years)	23 (± 2.0)	23.9 (± 7.9)	28.4 (± 2.22)
Parity	0-3	0-7	0-3

Table 2

Bacterial clone references used for JEG-3 NLRP7 knock down cell lines creation

Cell lines ID	Mission ShRNA Bacterial Glycerol stock reference
JEG3-Sh#1-NLRP7	TRCN0000128829
JEG3-Sh#2-NLRP7	TRCN0000149236
JEG3-Sh#3-NLRP7	TRCN0000148811
JEG3-Sh#4-NLRP7	TRCN0000128007
JEG3-Sh#5-NLRP7	TRCN0000148388

Table 3

Primers used for the RT-qPCR

Gene	Primer Forward	Primer Reverse	Temperature (°C)
NLRP7	TGCTGTACAAGACCATGACACG	ACTCAAGCCCTCACACAGAAAC	60
ASC	TGGATGCTCTGTACGGGAAG	CCAGGCTGGTGTGAAACTGAA	60
CASP1	TGCCTGTTCCTGTGATGTGG	TGTCCTGGGAAGAGGTAGAAACATC	60
IL-1b	GTCGGAGATTCGTAGCTGGAT	GTCGGAGATTCGTAGCTGGAT	60
IL-18	TGCCAACTCTGGCTGCTAAA	TTGTTGCGAGAGGAAGCGAT	60
18S	AAACGGCTACCACATCCAAG	CCTCCAATGGATCCTCGTTA	60
RPL0	TCGACAATGGCAGCATCTAC	ATCCGTCTCCACAGACAAGG	60
GAPDH	ACCCAGAAGACTGTGGATGG	TTCTAGACGGCAGGTCAGGT	60

Figure S1

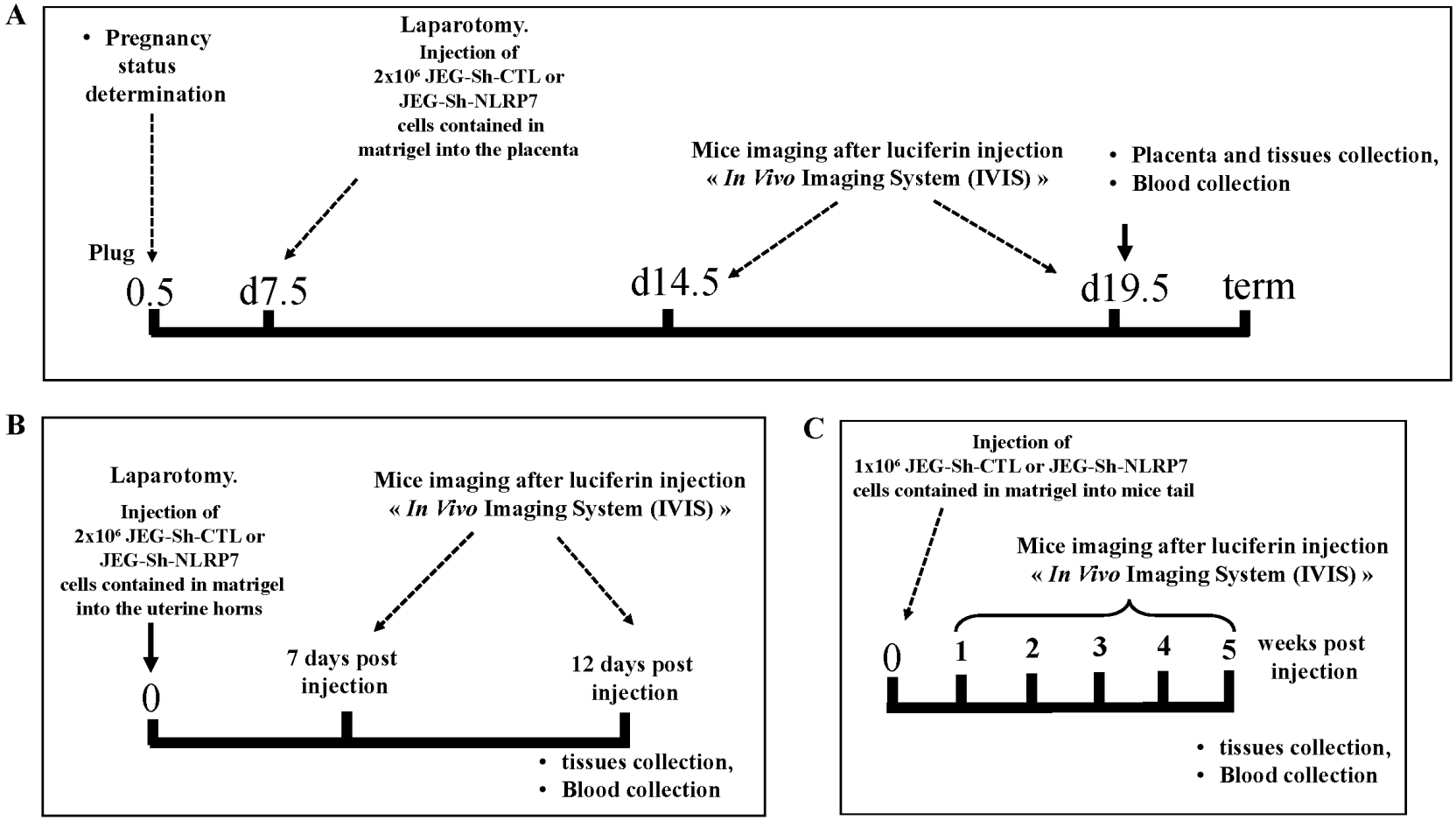

A
• Pregnancy status determination
Laparotomy.
Injection of 2x10⁶ JEG-Sh-CTL or JEG-Sh-NLRP7 cells contained in matrigel into the placenta
Mice imaging after luciferin injection « In Vivo Imaging System (IVIS) »
• Placenta and tissues collection,
• Blood collection
Plug
0.5
d7.5
d14.5
d19.5
term
B
Laparotomy.
Injection of 2x10⁶ JEG-Sh-CTL or JEG-Sh-NLRP7 cells contained in matrigel into the uterine horns
Mice imaging after luciferin injection « In Vivo Imaging System (IVIS) »
0
7 days post injection
12 days post injection
• tissues collection,
• Blood collection
C
Injection of 1x10⁶ JEG-Sh-CTL or JEG-Sh-NLRP7 cells contained in matrigel into mice tail
Mice imaging after luciferin injection « In Vivo Imaging System (IVIS) »
0
1
2
3
4
5
weeks post injection
• tissues collection,
• Blood collection

Figure S2

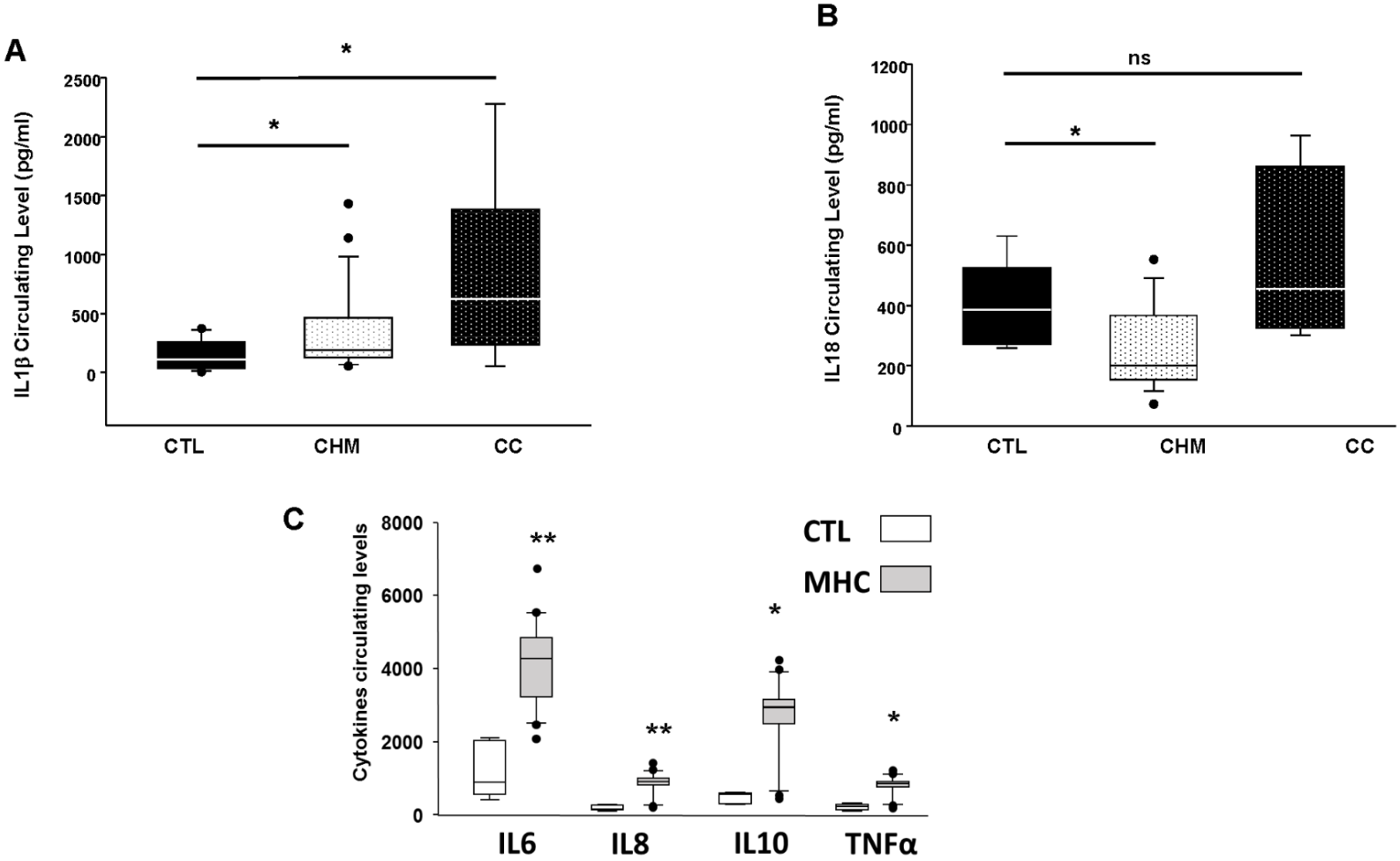
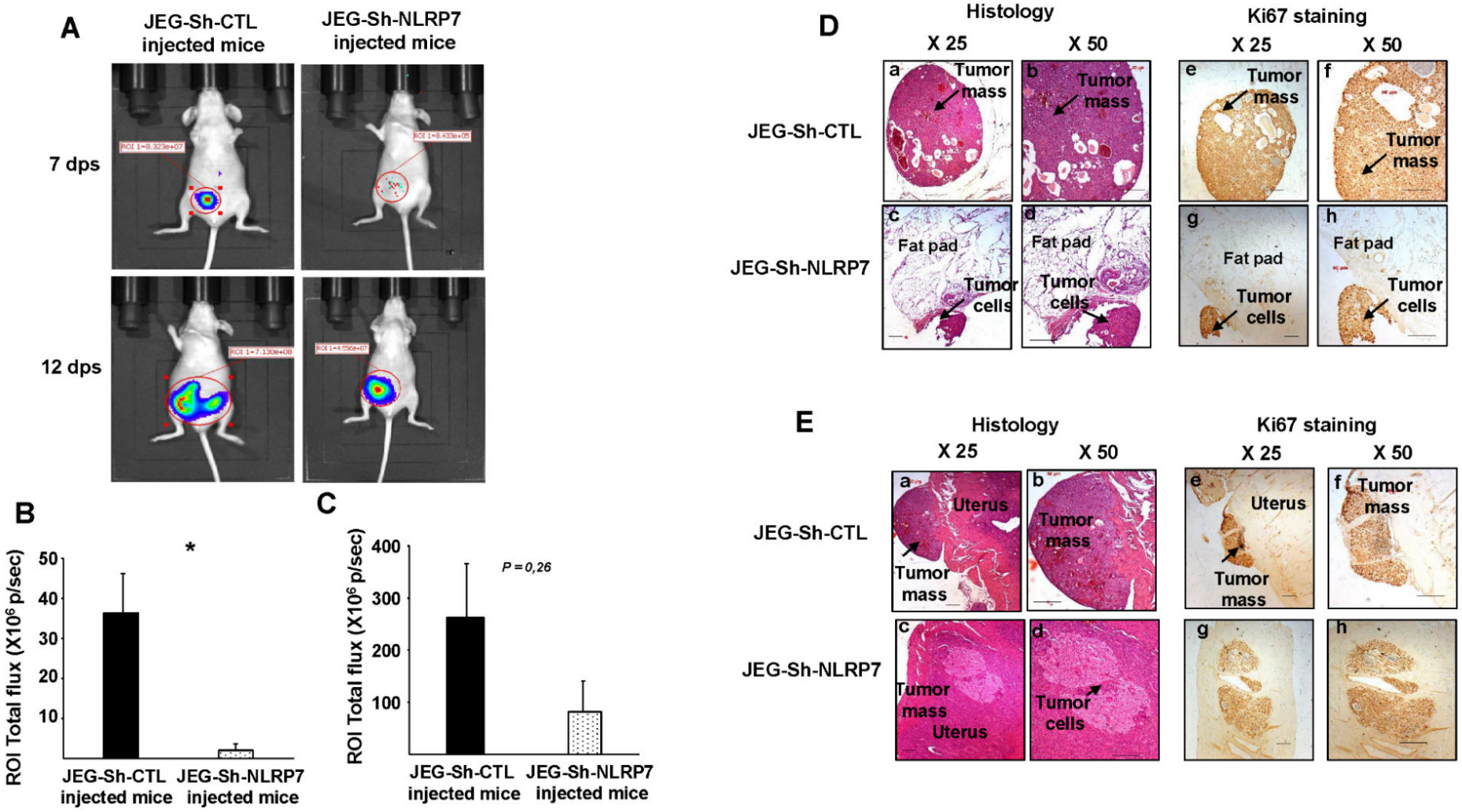

A
IL1β Circulating Level (pg/ml)
2500
2000
1500
1000
500
0
*
*
CTL
CHM
CC
B
IL18 Circulating Level (pg/ml)
1200
1000
800
600
400
200
0
ns
*
CTL
CHM
CC
C
Cytokines circulating levels
8000
6000
4000
2000
0
**
**
*
*
CTL
MHC
IL6
IL8
IL10
TNFα

Figure S3


A
JEG-Sh-CTL injected mice
JEG-Sh-NLRP7 injected mice
7 dps
12 dps
B
ROI Total flux (X10^6 p/sec)
50
40
30
20
10
*
JEG-Sh-CTL injected mice
JEG-Sh-NLRP7 injected mice
C
ROI Total flux (X10^6 p/sec)
400
300
200
100
P = 0,26
JEG-Sh-CTL injected mice
JEG-Sh-NLRP7 injected mice
D
Histology
X 25
X 50
Ki67 staining
X 25
X 50
JEG-Sh-CTL
JEG-Sh-NLRP7
a
b
c
d
e
f
g
h
Tumor mass
Fat pad
Tumor cells
E
Histology
X 25
X 50
Ki67 staining
X 25
X 50
JEG-Sh-CTL
JEG-Sh-NLRP7
Uterus
Tumor mass
Tumor cells

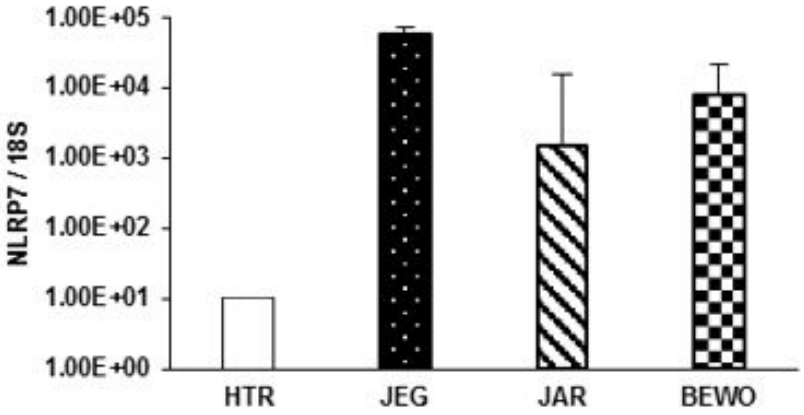


Figure 30 - Expression relative du gène NLRP7 dans quatre lignées trophoblastiques humaines

II. Résumé des résultats

L'ensemble des résultats obtenus dans cette publication nous a permis de dresser les conclusions suivantes :

- L'expression de NLRP7 et les effecteurs de son inflammasome sont dérégulés dans les tissus môlaires et choriocarcinomateux ainsi que dans la lignée tumorale humaine JEG-3.
- La protéine NLRP7 est positivement régulée par l'hypoxie dans les cellules JEG-3.
- NLRP7 participe contrôle la prolifération, la migration et l'invasion des trophoblastes tumoraux *in vitro* ainsi que leur capacité à croitre en l'absence d'ancrage.
- L'inhibition de NLRP7 diminue le développement et la progression des tumeurs *in vivo*.

III. Discussion

Cette étude nous a permis de démontrer l'implication directe de la protéine NLRP7 dans le développement et la progression du CC gestationnel. Nos résultats suggèrent fortement que NLRP7 est un acteur essentiel du développement de cette pathologie selon une voie inflammasome indépendante. Nos conclusions sont basées sur les résultats majeurs de notre étude démontrant une surexpression de NLRP7 dans cette pathologie, une absence d'expression et de sécrétion de l'interleukine 1β par les cellules de CC et un rôle direct dans le contrôle du développement et de la progression des tumeurs in vivo.

Choix du modèle cellulaire

Dans ce projet, nous avons fait le choix de travailler sur la lignée JEG-3 du choriocarcinome et non sur les autres lignées existantes à savoir JAR et BeWo. Deux raisons principales nous ont incités à faire ce choix. La première était basée sur la démonstration que les niveaux de NLRP7 étaient plus élevés dans les tissus môlaires et choriocarcinomateux que dans le tissu normal. Avec ce premier résultat, nous avons recherché une lignée cellulaire du CC présentant une surexpression de NLRP7 comparé aux cellules trophoblastiques normales. Nous avons ainsi comparé le statut de son transcrit dans des lignées cellulaires de CC et de trophoblastes non tumoraux. Nous disposons, au laboratoire, des trois lignées cellulaires de choriocarcinome les plus communément utilisés : JEG-3, BeWo et JAR. Nos expériences comparatives ont démontré que les cellules HTR8/SVneo, modèle non-tumoral représentatif du cytotrophoblaste extravilleux, exprimaient significativement moins de NLRP7 que les trois lignées du CC (figure 30).

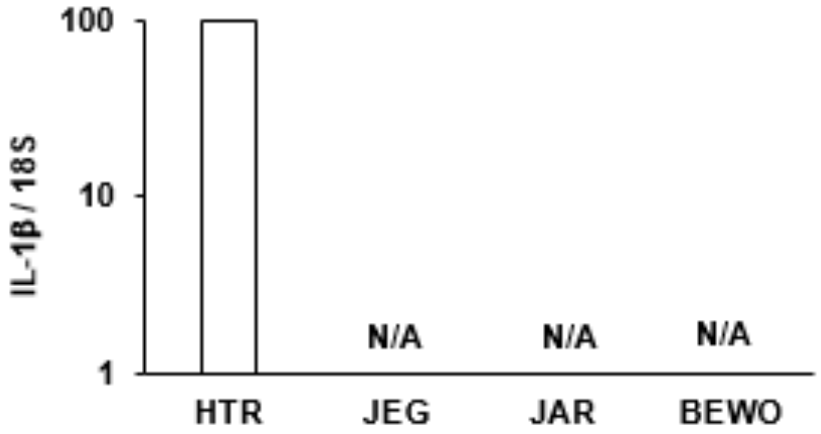


Figure 31 - Expression relative du gène IL-1β dans les lignées trophoblastiques humaines

La seconde raison était basée sur le fait que les cellules JEG-3 constituent le modèle cellulaire de choriocarcinome le plus invasif. Ces cellules sont assimilables aux cytotrophoblastes extravilleux. Les cellules BeWo représentent le syncytiotrophoblaste en raison de leur potentiel de fusion cellulaire très important tandis que les JAR présentent un phénotype intermédiaire entre les cytotrophoblastes villeux et extravilleux (Hannan, 2010).

Absence d'expression de l'IL-1β dans les cellules du CC

L'ensemble des résultats obtenus dans cette étude nous a permis de conclure à un rôle inflammasome indépendant de la protéine NLRP7 dans le CC. Cette conclusion est basée sur un résultat majeur qui est la démonstration que toutes les lignées cellulaires de CC dont nous disposons présentent, outre la surexpression de NLRP7, une absence totale d'expression de l'IL-1β (figure 31).

Cette absence d'expression de l'IL-1β n'a été trouvée que dans les cellules trophoblastiques tumorales car nous avons démontré que l'expression de cette cytokine était significativement augmentée dans les tissus môlaires (figure 1-C, Article 2). Ce résultat différenciant le tissu môlaire des lignées trophoblastiques tumorales peut s'expliquer par l'hétérogénéité du tissu. Les cellules immunitaires, sanguines, endothéliales et musculaires recouvrant les vaisseaux pourraient exprimer et produire l'IL-1β. Le même résultat a été obtenu au niveau circulant chez les patientes, suggérant que d'autres sources d'IL-1β peuvent contribuer à l'augmentation systémique de cette cytokine. Il est important de noter que les tissus môlaires étaient hétérogènes en structure avec un aspect très souvent sanguinolent. Nous avons constaté une variabilité très importante des niveaux d'expression d'IL-1β entre les patientes avec absence totale chez certaines d'entre elles.

Choix des modèles animaux

Comme rapporté dans l'article, trois voies d'injection des cellules tumorales JEG-3 ont été utilisées dans ce projet. Dans un premier temps, nous avons exploité le modèle de choriocarcinome orthoptique développé par notre équipe. Nous avons injecté les cellules JEG-3 contrôles ou sous-exprimant la protéine NLRP7 directement dans la décidue des placentas à 7,5 jpc. Ce modèle permet de mimer le développement du CC depuis son site primaire sous l'influence de l'environnement placentaire. Afin de déterminer l'influence de celui-ci sur le développement et la progression du CC, nous avons comparé ce modèle à un second modèle qui consiste en l'injection du même nombre de cellules dans les cornes utérines chez les souris non gestantes. Ces deux modèles nous ont permis de mettre en évidence le rôle de l'environnement placentaire dans la prise tumorale du CC en l'absence ou en présence de NLRP7.

En raison du temps relativement court de la gestation chez la souris (20,5 jpc), il ne nous a été possible de suivre le développement des tumeurs que pendant 12 jours post injection. Ce temps très court ne nous a pas permis de conclure quant au rôle de la protéine NLRP7 dans la progression du CC. Ainsi, nous avons utilisé le modèle métastatique de CC qui consiste en l'injection des cellules tumorales directement dans la veine de la queue de la souris puis nous avons suivi le développement des métastases sur cinq semaines. Grâce à ce modèle, nous avons pu conclure que la protéine NLRP7 est impliquée dans le développement des métastases du CC et de leur tropisme vers le poumon, phénomène métastatique bien décrit dans le choriocarcinome gestationnel.

Retombées et perspectives cliniques de nos résultats

Du fait de l'association étroite entre les mutations dans le gène *NLRP7* et la survenue des MH pouvant évoluer vers un choriocarcinome, ces dernières années le travail sur le gène *NLRP7* a pris une grande importance translationnelle dans la recherche sur les maladies gestationnelles trophoblastiques.

A ce jour, très peu d'études se sont intéressées au rôle de la protéine NLRP7 dans la genèse du CC. Ainsi, les résultats obtenus à travers notre étude apportent des informations clés sur le statut et le rôle de cette protéine dans le CC gestationnel. Par ailleurs elles ouvrent des perspectives pertinentes pour les communautés scientifique et clinicienne s'intéressant à l'étude du choriocarcinome.

De par la surexpression de la protéine NLRP7 dans les cellules tumorales et dans le tissu môlaire et choriocarcinomateux, notre projet a vite été guidé vers l'invalidation de cette expression et la recherche d'un rôle. Néanmoins, il serait intéressant de mener, dans un deuxième temps, un projet de reproduction des mutations les plus fréquentes et les plus sévères dans le trophoblaste et d'en caractériser les effets *in vitro* et *in vivo*.

Cette idée est nourrie par les travaux du Pr R. Slim et al. de 2012 (Slim, 2012) qui ont mis en évidence une fréquence augmentée de certains variants de *NLRP7* dans les populations sénégalaise et tunisienne connues pour avoir une incidence accrue de CC et de MH.

Ce projet d'étude des effets des mutations de *NLRP7* serait plus appliqué à la problématique clinique de la survenue des môles. Il pourrait aussi nous permettre d'apporter de nouvelles pistes de réponses plus appropriées pour la prise en charge et le traitement des patientes.

Conclusions et perspectives

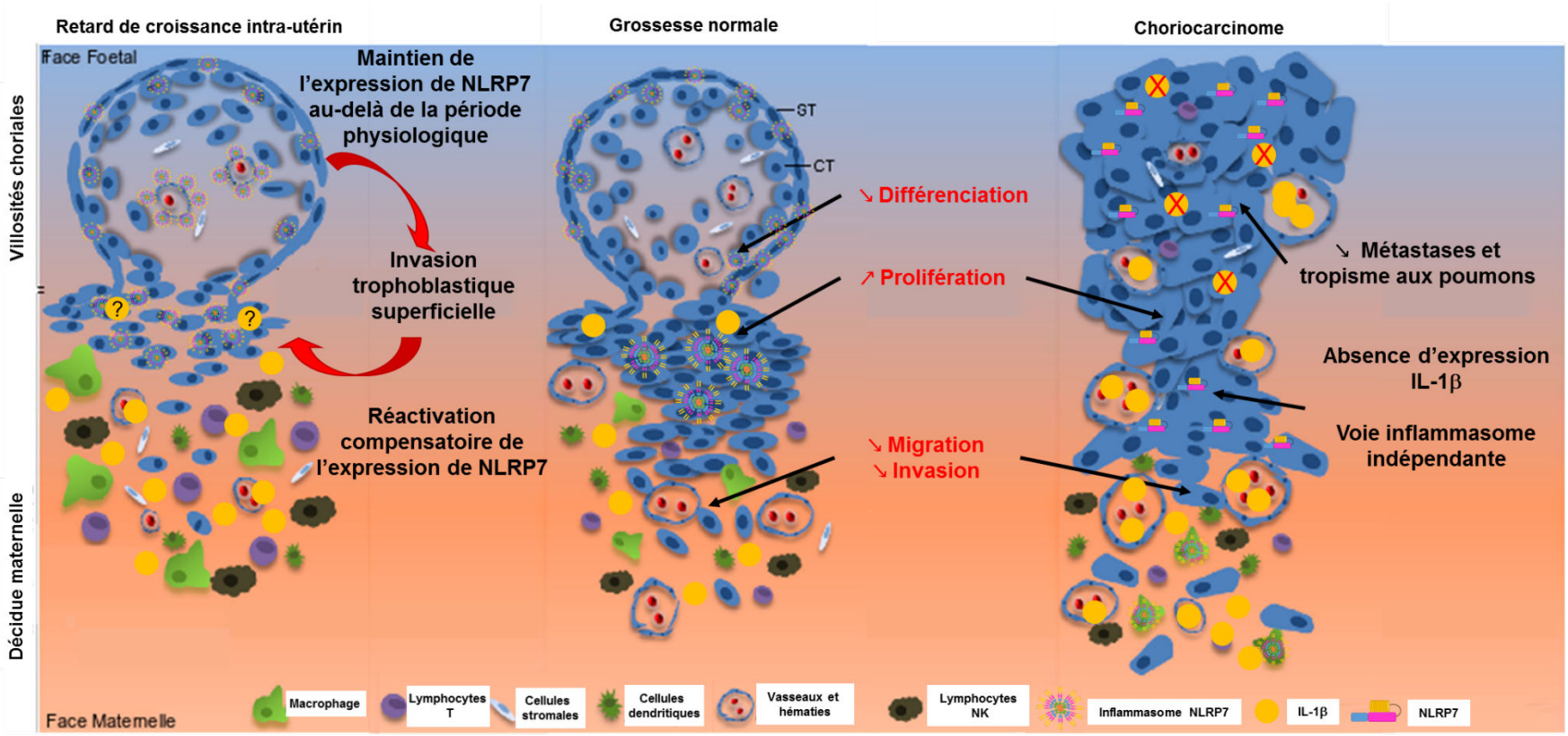


Figure 32 - Schéma de conclusion sur le rôle de la protéine NLRP7 dans les grossesses normales et pathologiques

Figure adaptée de Louwen, 2012.

Dans le placenta normal, la protéine NLRP7 peut assurer sa fonction d'inflammasome. Elle contribuerait au maintien d'un état indifférencié des cellules trophoblastiques par inhibition de leur invasion au profit de la formation du syncytiotrophoblaste et à leur prolifération importante au cours du premier trimestre de la grossesse.

La surexpression de la protéine NLRP7 dans la pathologie du retard de croissance intra-utérin peut être la cause ou la conséquence de la survenue de cette pathologie. Une surexpression de la protéine NLRP7 au-delà de sa période physiologique (≈10 SA) pourrait être à l'origine d'une invasion superficielle des artères spiralées maternelles contribuant au développement d'un retard de croissance intra-utérin. A l'inverse, une augmentation de l'expression de la protéine NLRP7 survenant après la période normale de son expression et dans un contexte de RCIU, peut s'expliquer comme un rôle compensatoire joué par la protéine. Dans ce cas sa surexpression serait une conséquence de la pathologie. A noter que l'hypoxie placentaire est un paramètre étroitement associé à la pathologie du le RCIU et que NLRP7 est régulé positivement par l'hypoxie.

Dans la pathologie du choriocarcinome, la protéine NLRP7 contribue à la prolifération importante des cellules trophoblastiques au détriment de leurs capacités migratoire et invasive. Les effets de la protéine NLRP7 dans le choriocarcinome, s'exercent par une voie inflammasome indépendante en raison de l'absence de l'effecteur principal de cette voie, l'IL-1β.

Mon travail de thèse a permis de démontrer pour la première fois le rôle de la protéine NLRP7 dans les placentations normale et tumorale.

Comme illustré sur la figure 32, nous avons démontré que la protéine NLRP7 est abondamment exprimée au cours de la période hypoxique du développement placentaire et qu'elle contrôle les phénomènes de différenciation, prolifération, migration et invasion des trophoblastes. Le rôle physiologique de la protéine NLRP7 au cours du premier trimestre de la grossesse serait donc de contribuer au maintien d'un niveau de prolifération très important des cytotrophoblastes villeux tout en limitant leur différenciation vers des cellules extravillositaires ou syncytio-trophoblastiques. L'acquisition d'un caractère invasif trop précoce porterait préjudice au développement normal du placenta.

Nous avons également démontré que l'expression de la protéine NLRP7 et de certains de ses partenaires de l'inflammasome sont dérégulées dans la pathologie du RCIU. Ces phénomènes de surexpression de NLRP7 et surproduction des cytokines pro-inflammatoires dans les cas de RCIU idiopathiques pourraient être soit causal soit compensatoire. En effet, en réponse à une invasion trophoblastique trop superficielle des artères spiralées utérines et au phénomène de persistance d'hypoxie placentaire, la réaugmentation de l'expression de la protéine NLRP7 permettrait la réactivation des processus de prolifération trophoblastique généralement observée lors de processus compensatoires. *A contrario*, un maintien de l'expression de la protéine NLRP7 au-delà de sa période physiologique pourrait induire un phénomène inflammatoire important associé à un défaut de remodelage des artères spiralées maternelles, deux causes majeures de la survenue du RCIU.

En l'absence de modèle animal pour l'étude du rôle de la protéine NLRP7 *in vivo*, seule une étude clinique prospective chez l'humain permettrait de conclure sur le lien entre la protéine NLRP7 et la survenue du RCIU.

Dans un second temps, nous avons démontré le rôle direct de la protéine NLRP7 dans le développement et la progression du choriocarcinome. Nos travaux soulignent l'intérêt de cette protéine de l'inflammasome en tant que biomarqueur potentiel et/ou nouvelle cible thérapeutique du CC. Nous avons mis en évidence une surexpression de la protéine NLRP7 dans les tissus môlaires et choriocarcinomateux associée à un rôle majeur dans la promotion de la prolifération des trophoblastes tumoraux au détriment de leurs capacités migratoire et invasive *in vitro*. L'ensemble de nos expérimentations *in vivo* nous ont permis de mettre en évidence le rôle direct de la protéine NLRP7 dans la tumorigenèse placentaire sous l'influence directe de l'environnement placentaire.

Nous avons également pu démontrer le rôle de NLRP7 dans le développement des métastases et le tropisme aux poumons. En l'absence d'expression de la principale cytokine pro-inflammatoire dans les lignées choriocarcinomateuses, IL-1β, nous pouvons donc conclure que la protéine NLRP7 joue un rôle majeur dans le développement du CC par une voie inflammasome indépendante.

Les travaux réalisés sur la protéine NLRP7, dans un contexte normal ou tumoral, permettent une ouverture sur des perspectives à court et long termes intéressantes. Les perspectives d'étude retenues par notre groupe sont listées ci-dessous. A court terme, nous pensons mener les expériences suivantes :

Comparaison transcriptomique (RNAseq) entre cellules JEG-3 normales et sous-exprimant le gène NLRP7

Après le développement et la caractérisation de la lignée ShNLRP7 et dans l'objectif de mieux comprendre l'effet du « knockdown » de ce gène, nous avons réalisé un séquençage haut débit des ARNs totaux de ces 2 lignées de cellules. Les résultats actuellement en cours d'analyse permettront d'élargir nos connaissances sur la réponse de la cellule tumorale face à la baisse d'expression du gène *NLRP7*. Les gènes les plus différentiellement exprimés suite à l'invalidation de *NLRP7* seront caractérisés *in vitro*. Ce travail sera poursuivi par une étudiante en Master 2 qui rejoindra l'équipe en Janvier 2019.

Comparaison des cytokines circulantes (cytokine array) dans les sera de souris injectées par les cellules JEG3-Sh-CTL ou JEG3-Sh-NLRP7

La comparaison de cytokines circulantes entre les deux groupes de souris nous permettra de déterminer si l'invalidation de *NLRP7* influence le panel inflammatoire, *in vivo*. Cette expérience apportera des réponses à notre questionnement sur la source de l'IL-1β, dosé chez les patientes, mais indétectable dans les cellules tumorales.

Ces expériences sont programmées pour être réalisées et ajoutées aux résultats de la publication n° 2 avant sa soumission.

Caractérisation de la voie NF-kB dans les cellules du CC

D'une part, nos résultats démontrent que la protéine NLRP7 fonctionnerait de manière inflammasome indépendante et qu'elle exercerait des effets anti-inflammatoires ; d'autre part, les données de la littérature proposent un modèle de régulation négative de la voie NF-κB par la protéine NLRP7.

L'ensemble suggère que des régulations négatives de la voie NF-κB pourraient être à l'origine de l'absence d'expression de l'IL-1β dans les lignées cellulaires du choriocarcinome. En effet, un des modes d'action anti-inflammatoire, décrit pour cette protéine, s'exercerait par l'intermédiaire de l'inhibition de la translocation au noyau de ce facteur de transcription (Figure 28) (Radian, 2015). L'absence totale d'expression de l'IL-1β dans les lignées cellulaires de CC pourrait être une conséquence de la surexpression de NLRP7. Les différents outils cellulaires que j'ai généré au cours de ma thèse, cellules JEG3-Sh-NLRP7 et HTR-Sh-NLRP7, ainsi que les résultats obtenus par l'analyse RNAseq pourront être exploités pour étayer le mécanisme d'action de la protéine NLRP7 dans les cellules du CC. Ce sous-projet pourrait faire l'objet d'une nouvelle publication.

A plus long terme, il serait intéressant de développer les projets suivants :

Surexpression de la protéine NLRP7 dans les cellules HTR8/SVneo.

Nos études comparatives des niveaux d'expression de la protéine NLRP7 entre les lignées trophoblastiques tumorales (JEG-3, JAR et Bewo) et la lignée non tumorale HTR8/SV neo ont montré que cette dernière exprimait peu de NLRP7. Ce faible taux d'expression de NLRP7 dans ce type cellulaire représentatif du trophoblaste invasif est en accord avec nos résultats de la première publication. Ceux-ci démontrent une perte d'expression de la protéine NLRP7 dans les cellules trophoblastiques qui acquièrent un caractère invasif et des marqueurs de l'invasion comme la protéine HLA-G. Ainsi, dans des expériences futures, il serait intéressant de surexprimer la protéine NLRP7 dans ce type cellulaire et d'étudier l'impact de cette surexpression sur des paramètres clés du développement. Ce type cellulaire peut aussi être utilisé pour étudier les mutations pathologiques les plus fréquentes et sévères associées au développement des BiMH (Khare, 2012).

Etude des effets sur la mise bas de l'injection orthotopique de cellules JEG-3

En parallèle des expériences dans lesquelles j'ai injecté des cellules JEG-3 chez la souris gestante, j'ai également testé l'effet de l'injection de cellules HTR Luciférase-positives en suivant le même protocole (nombre de cellules et durée de l'expérience). Ces expériences préliminaires ont démontrées que les cellules HTR non modifiées pour le gène *NLRP7* et injectées dans la décidue maternelle à 7,5 jpc ne perturbent ni la placentation, ni la mise-bas des souris à terme. Ces expériences soulignent le caractère inoffensif des cellules HTR et confirment le caractère très agressif des cellules JEG-3. L'injection de ces dernières cellules affecte non seulement la placentation des souris (Résorption des unités fœto-placentaire, arrêt de développement tardif des embryons) mais également le processus de parturition. En effet, nous avons remarqué que ces souris étaient dans l'incapacité totale d'expulser les produits de conception.

Au vu de ces observations, il nous parait intéressant de mener des expériences plus poussées pour comprendre si les problèmes de parturition observés sont purement dus à la résorption de la majorité des placentas et donc à un défaut de déclenchement du processus, ou si les cellules JEG-3 secrètent des facteurs qui influenceraient le mécanisme.

NLRP7 dans la vascularisation tumorale.

Dans la première publication, nous avons mis en évidence une expression péri-vasculaire et endothéliale de la protéine NLRP7 au sein de la villosité placentaire ; expression qui était plus importante dans les villosités issues de placentas avec RCIU. A ce jour, aucune donnée n'existe dans la littérature quant à l'expression et le rôle de la protéine NLRP7 dans les cellules endothéliales. Des expériences préliminaires menées au sein de l'équipe ont démontré l'expression de la protéine dans les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC). De par les fonctions pro- et anti-inflammatoires associées à la protéine NLRP7 dans le placenta, il serait très intéressant de déterminer le rôle de cette protéine dans l'angiogenèse placentaire normale ou pathologique, cas de la prééclampsie et du RCIU. Dans le contexte du choriocarcinome, il serait intéressant de ***i)*** de déterminer les niveaux d'expression de la protéine NLRP7 et de ses effecteurs dans la composante endothéliale, ***ii)*** comparer les effets des milieux conditionnés issus des cellules tumorale, JEG-3, et de la cellule non tumorale, HTR8/SV neo sur l'expression et l'activité de l'inflammasome dans la cellule endothéliale, ***iii)*** déterminer la régulation potentielle de la protéine NLRP7 par les facteurs pro-angiogènes placentaires.

QUID d'une régulation croisée de l'EG-VEGF et de la protéine NLRP7

Les résultats publiés par notre groupe sur le facteur EG-VEGF depuis plus d'une dizaine d'années et les résultats obtenus lors de mon projet de thèse sur la protéine NLRP7 montrent plusieurs similarités dans le profil d'expression et dans le rôle de ces protéines dans les placentations normale et tumorale. Comme pour NLRP7, nous avions démontré qu'EG-VEGF est exprimée au cours de la période précoce du développement placentaire, qu'elle est régulée par l'hypoxie, que son expression est augmentée dans les pathologies de la grossesse. Notre dernière publication a démontré le rôle majeur du facteur EG-VEGF dans le développement et la progression du choriocarcinome ainsi que la diminution du développement et de la progression tumorale par l'antagonisation de ses récepteurs (Traboulsi, 2017). Ces similarités entre deux protéines n'appartenant pas à la même famille laissent penser qu'elles seraient dues au hasard.

Néanmoins, il est important de noter que ces protéines sont toutes deux impliquées dans des processus inflammatoires. Si cette notion est bien établie pour la protéine NLRP7, elle ne l'est que peu pour la protéine EG-VEGF. Ce facteur de croissance appartient néanmoins à la famille des prokinéticines, largement décrite pour ses fonctions pro-inflammatoires (Cheng, 2012 ; Zhou, 2012 ; Qu, 2012).

Au vu de toutes ces observations, nous pensons qu'il serait intéressant de rechercher des régulations potentielles de la protéine NLRP7 par la protéine pro-angiogène et pro-inflammatoire, EG-VEGF.

Références

Bibliographie

Abalos, E., L. Duley and D. W. Steyn (2014). "Antihypertensive drug therapy for mild to moderate hypertension during pregnancy." Cochrane Database Syst Rev(2): CD002252.

Adamson, S. L., Y. Lu, K. J. Whiteley, D. Holmyard, M. Hemberger, C. Pfarrer and J. C. Cross (2002). "Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta." Dev Biol **250**(2): 358-373.

Agboola, A. (1979). "Trophoblastic neoplasia in an African urban population." J Natl Med Assoc **71**(10): 935-937.

Aguilar, P. S., M. K. Baylies, A. Fleissner, L. Helming, N. Inoue, B. Podbilewicz, H. Wang and M. Wong (2013). "Genetic basis of cell-cell fusion mechanisms." Trends Genet **29**(7): 427-437.

Ahamed, E., D. Short, B. North, P. M. Savage and M. J. Seckl (2012). "Survival of women with gestational trophoblastic neoplasia and liver metastases: is it improving?" J Reprod Med **57**(5-6): 262-269.

Akoury, E., L. Zhang, A. Ao and R. Slim (2015). "NLRP7 and KHDC3L, the two maternal-effect proteins responsible for recurrent hydatidiform moles, co-localize to the oocyte cytoskeleton." Hum Reprod **30**(1): 159-169.

Alfirevic, Z., D. Roberts and V. Martlew (2002). "How strong is the association between maternal thrombophilia and adverse pregnancy outcome? A systematic review." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **101**(1): 6-14.

Aljunaidy, M. M., J. S. Morton, C. M. Cooke and S. T. Davidge (2017). "Prenatal hypoxia and placental oxidative stress: linkages to developmental origins of cardiovascular disease." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **313**(4): R395-R399.

American College of Obstetricians & Gynecologists (2013). "Task Force on Hypertension in Pregnancy." Obstet Gynecol **122**(5): 1122-1131.

American College of Obstetricians & Gynecologists (2002). "Committee opinion #266: placenta accreta." Obstetrics & Gynecology **99**(1): 169-170.

Amin, J., D. Boche and S. Rakic (2017). "What do we know about the inflammasome in humans?" Brain Pathol **27**(2): 192-204.

Amir, S. M., R. Osathanondh, R. S. Berkowitz and D. P. Goldstein (1984). "Human chorionic gonadotropin and thyroid function in patients with hydatidiform mole." Am J Obstet Gynecol **150**(6): 723-728.

Aplin, J. D. (1991). "Implantation, trophoblast differentiation and haemochorial placentation: mechanistic evidence in vivo and in vitro." J Cell Sci **99 (Pt 4)**: 681-692.

Arima, T., T. Imamura, S. Amada, M. Tsuneyoshi and N. Wake (1994). "Genetic origin of malignant trophoblastic neoplasms." Cancer Genet Cytogenet **73**(2): 95-102.

Arroyo, J. A. and V. D. Winn (2008). "Vasculogenesis and angiogenesis in the IUGR placenta." Semin Perinatol **32**(3): 172-177.

Athanassiades, A., G. S. Hamilton and P. K. Lala (1998). "Vascular endothelial growth factor stimulates proliferation but not migration or invasiveness in human extravillous trophoblast." Biol Reprod **59**(3): 643-654.

Ayangade, O. (1979). "Gestational trophoblastic disease in Nigeria- A 10 year review." East Afr Med J **56**(6): 278-282.

Baker, P. J., D. Boucher, D. Bierschenk, C. Tebartz, P. G. Whitney, D. B. D'Silva, M. C. Tanzer, M. Monteleone, A. A. Robertson, M. A. Cooper, S. Alvarez-Diaz, M. J. Herold, S. Bedoui, K. Schroder and S. L. Masters (2015). "NLRP3 inflammasome activation downstream of cytoplasmic LPS recognition by both caspase-4 and caspase-5." Eur J Immunol **45**(10): 2918-2926.

Banet, N., C. DeScipio, K. M. Murphy, K. Beierl, E. Adams, R. Vang and B. M. Ronnett (2014). "Characteristics of hydatidiform moles: analysis of a prospective series with p57 immunohistochemistry and molecular genotyping." Mod Pathol **27**(2): 238-254.

Barker, D. J. (1995). "Fetal origins of coronary heart disease." BMJ **311**(6998): 171-174.

Barker, D. J. (1995) b. "Intrauterine programming of adult disease." Mol Med Today **1**(9): 418-423.
Bartels, H. C., J. D. Postle, P. Downey and D. J. Brennan (2018). "Placenta Accreta Spectrum: A Review of Pathology, Molecular Biology, and Biomarkers." Dis Markers **2018**: 1507674.
Bartha, J. L. and R. Comino-Delgado (1999). "Lymphocyte subpopulations in intrauterine growth retardation in women with or without previous pregnancies." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **82**(1): 23-27.
Bartha, J. L., R. Romero-Carmona and R. Comino-Delgado (2003). "Inflammatory cytokines in intrauterine growth retardation." Acta Obstet Gynecol Scand **82**(12): 1099-1102.
Bastida-Ruiz, D., K. Van Hoesen and M. Cohen (2016). "The Dark Side of Cell Fusion." Int J Mol Sci **17**(5).
Beaman, K. D., S. Dambaeva, G. K. Katara, A. Kulshrestha and A. Gilman-Sachs (2017). "The immune response in pregnancy and in cancer is active and supportive of placental and tumor cell growth not their destruction." Gynecol Oncol **145**(3): 476-480.
Bebbere, D., L. Masala, D. F. Albertini and S. Ledda (2016). "The subcortical maternal complex: multiple functions for one biological structure?" J Assist Reprod Genet **33**(11): 1431-1438.
Benirschke, K. (2013). "Monozygotic Twinning." Surg Pathol Clin **6**(1): 27-32.
Berkowitz, R. S., D. W. Cramer, M. R. Bernstein, S. Cassells, S. G. Driscoll and D. P. Goldstein (1985). "Risk factors for complete molar pregnancy from a case-control study." Am J Obstet Gynecol **152**(8): 1016-1020.
Binker, M. G., A. A. Binker-Cosen, D. Richards, B. Oliver and L. I. Cosen-Binker (2009). "EGF promotes invasion by PANC-1 cells through Rac1/ROS-dependent secretion and activation of MMP-2." Biochem Biophys Res Commun **379**(2): 445-450.
Blaise, S., N. de Parseval, L. Benit and T. Heidmann (2003). "Genomewide screening for fusogenic human endogenous retrovirus envelopes identifies syncytin 2, a gene conserved on primate evolution." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(22): 13013-13018.
Blois, S. M., B. F. Klapp and G. Barrientos (2011). "Decidualization and angiogenesis in early pregnancy: unravelling the functions of DC and NK cells." J Reprod Immunol **88**(2): 86-92.
Blond, J. L., F. Beseme, L. Duret, O. Bouton, F. Bedin, H. Perron, B. Mandrand and F. Mallet (1999). "Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new human endogenous retrovirus family." J Virol **73**(2): 1175-1185.
Boucher, D., M. Monteleone, R. C. Coll, K. W. Chen, C. M. Ross, J. L. Teo, G. A. Gomez, C. L. Holley, D. Bierschenk, K. J. Stacey, A. S. Yap, J. S. Bezbradica and K. Schroder (2018). "Caspase-1 self-cleavage is an intrinsic mechanism to terminate inflammasome activity." J Exp Med **215**(3): 827-840.
Boufettal, H., P. Coullin, S. Mahdaoui, M. Noun, S. Hermas and N. Samouh (2011). "[Complete hydatiforme mole in Morocco: epidemiological and clinical study]." J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) **40**(5): 419-429.
Brien, M. E., C. Duval, J. Palacios, I. Boufaied, A. A. Hudon-Thibeault, M. Nadeau-Vallee, C. Vaillancourt, C. P. Sibley, V. M. Abrahams, R. L. Jones and S. Girard (2017). "Uric Acid Crystals Induce Placental Inflammation and Alter Trophoblast Function via an IL-1-Dependent Pathway: Implications for Fetal Growth Restriction." J Immunol **198**(1): 443-451.
Broz, P. (2016). "Inflammasomes in Host Defense and Autoimmunity." Chimia (Aarau) **70**(12): 853-855.
Burchell, R. C. (1967). "Arterial blood flow into the human intervillous space." Am J Obstet Gynecol **98**(3): 303-311.
Burton, G. J., A. L. Watson, J. Hempstock, J. N. Skepper and E. Jauniaux (2002). "Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy." J Clin Endocrinol Metab **87**(6): 2954-2959.
Capella-Allouc, S., F. Morsad, C. Rongieres-Bertrand, S. Taylor and H. Fernandez (1999). "Hysteroscopic treatment of severe Asherman's syndrome and subsequent fertility." Hum Reprod **14**(5): 1230-1233.

Chae, J. J., Y. H. Cho, G. S. Lee, J. Cheng, P. P. Liu, L. Feigenbaum, S. I. Katz and D. L. Kastner (2011). "Gain-of-function Pyrin mutations induce NLRP3 protein-independent interleukin-1beta activation and severe autoinflammation in mice." Immunity **34**(5): 755-768.

Charolidi, N., A. J. Host, S. Ashton, Z. Tryfonos, K. Leslie, B. Thilaganathan, J. E. Cartwright and G. S. Whitley (2018). "First trimester placental endothelial cells from pregnancies with abnormal uterine artery Doppler are more sensitive to apoptotic stimuli." Lab Invest.

Cheng, M. Y., A. G. Lee, C. Culbertson, G. Sun, R. K. Talati, N. C. Manley, X. Li, H. Zhao, D. M. Lyons, Q. Y. Zhou, G. K. Steinberg and R. M. Sapolsky (2012). "Prokineticin 2 is an endangering mediator of cerebral ischemic injury." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(14): 5475-5480.

Cotechini, T., M. Komisarenko, A. Sperou, S. Macdonald-Goodfellow, M. A. Adams and C. H. Graham (2014). "Inflammation in rat pregnancy inhibits spiral artery remodeling leading to fetal growth restriction and features of preeclampsia." J Exp Med **211**(1): 165-179.

Coward, J. and A. Harding (2014). "Size Does Matter: Why Polyploid Tumor Cells are Critical Drug Targets in the War on Cancer." Front Oncol **4**: 123.

Cross, J. C., Z. Werb and S. J. Fisher (1994). "Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle." Science **266**(5190): 1508-1518.

Dall'Asta, A., V. Brunelli, F. Prefumo, T. Frusca and C. C. Lees (2017). "Early onset fetal growth restriction." Matern Health Neonatol Perinatol **3**: 2.

De Benedetti, F., M. Gattorno, J. Anton, E. Ben-Chetrit, J. Frenkel, H. M. Hoffman, I. Kone-Paut, H. J. Lachmann, S. Ozen, A. Simon, A. Zeft, I. Calvo Penades, M. Moutschen, P. Quartier, O. Kasapcopur, A. Shcherbina, M. Hofer, P. J. Hashkes, J. Van der Hilst, R. Hara, S. Bujan-Rivas, T. Constantin, A. Gul, A. Livneh, P. Brogan, M. Cattalini, L. Obici, K. Lheritier, A. Speziale and G. Junge (2018). "Canakinumab for the Treatment of Autoinflammatory Recurrent Fever Syndromes." N Engl J Med **378**(20): 1908-1919.

Demir, R., P. Kaufmann, M. Castellucci, T. Erbengi and A. Kotowski (1989). "Fetal vasculogenesis and angiogenesis in human placental villi." Acta Anat (Basel) **136**(3): 190-203.

Deng, L., J. Zhang, T. Wu and T. A. Lawrie (2013). "Combination chemotherapy for primary treatment of high-risk gestational trophoblastic tumour." Cochrane Database Syst Rev(1): CD005196.

Devery, A. M., R. Wadekar, S. M. Bokobza, A. M. Weber, Y. Jiang and A. J. Ryan (2015). "Vascular endothelial growth factor directly stimulates tumour cell proliferation in non-small cell lung cancer." Int J Oncol **47**(3): 849-856.

Diejomaoh, F. M., A. E. Omu, E. E. Okpere, M. Ezimokhai, O. Tabowei and L. N. Ajabor (1984). "The problems of management of gestational trophoblastic neoplasms at the University of Benin Teaching Hospital, Benin City, Nigeria." Adv Exp Med Biol **176**: 417-428.

Ditisheim, A., M. Boulvain, O. Irion and A. Pechere-Bertschi (2015). "[Atypical presentation of preeclampsia]." Rev Med Suisse **11**(485): 1655-1658.

Docherty, L. E., F. I. Rezwan, R. L. Poole, C. L. Turner, E. Kivuva, E. R. Maher, S. F. Smithson, J. P. Hamilton-Shield, M. Patalan, M. Gizewska, J. Peregud-Pogorzelski, J. Beygo, K. Buiting, B. Horsthemke, L. Soellner, M. Begemann, T. Eggermann, E. Baple, S. Mansour, I. K. Temple and D. J. Mackay (2015). "Mutations in NLRP5 are associated with reproductive wastage and multilocus imprinting disorders in humans." Nat Commun **6**: 8086.

Doridot, L., B. Passet, C. Mehats, V. Rigourd, S. Barbaux, A. Ducat, F. Mondon, M. Vilotte, J. Castille, M. Breuiller-Fouche, N. Daniel, F. le Provost, A. L. Bauchet, V. Baudrie, A. Hertig, C. Buffat, U. Simeoni, G. Germain, J. L. Vilotte and D. Vaiman (2013). "Preeclampsia-like symptoms induced in mice by fetoplacental expression of STOX1 are reversed by aspirin treatment." Hypertension **61**(3): 662-668.

Dreyfus, M., I. Tissier and E. Philippe (2000). "[Gestational trophoblastic diseases. Classification, epidemiology and genetic data]." J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) **29**(2): 125-130.

Dupressoir, A., G. Marceau, C. Vernochet, L. Benit, C. Kanellopoulos, V. Sapin and T. Heidmann (2005). "Syncytin-A and syncytin-B, two fusogenic placenta-specific murine envelope genes of retroviral origin conserved in Muridae." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(3): 725-730.

Duzyj, C. M., I. A. Buhimschi, H. Motawea, C. A. Laky, G. Cozzini, G. Zhao, E. F. Funai and C. S. Buhimschi (2015). "The invasive phenotype of placenta accreta extravillous trophoblasts associates with loss of E-cadherin." Placenta **36**(6): 645-651.

Eaton, B. M., L. Leach and J. A. Firth (1993). "Permeability of the fetal villous microvasculature in the isolated perfused term human placenta." J Physiol **463**: 141-155.

Eisenbarth, S. C., A. Williams, O. R. Colegio, H. Meng, T. Strowig, A. Rongvaux, J. Henao-Mejia, C. A. Thaiss, S. Joly, D. G. Gonzalez, L. Xu, L. A. Zenewicz, A. M. Haberman, E. Elinav, S. H. Kleinstein, F. S. Sutterwala and R. A. Flavell (2012). "NLRP10 is a NOD-like receptor essential to initiate adaptive immunity by dendritic cells." Nature **484**(7395): 510-513.

Feng, S., D. Fox and S. M. Man (2018). "Mechanisms of Gasdermin Family Members in Inflammasome Signaling and Cell Death." J Mol Biol **430**(18 Pt B): 3068-3080.

Finetti, M., A. Omenetti, S. Federici, R. Caorsi and M. Gattorno (2016). "Chronic Infantile Neurological Cutaneous and Articular (CINCA) syndrome: a review." Orphanet J Rare Dis **11**(1): 167.

Fitzpatrick, K. E., S. Sellers, P. Spark, J. J. Kurinczuk, P. Brocklehurst and M. Knight (2014). "The management and outcomes of placenta accreta, increta, and percreta in the UK: a population-based descriptive study." BJOG **121**(1): 62-70; discussion 70-61.

Fleming, E. L., L. Garrett, W. B. Growdon, M. Callahan, N. Nevadunsky, S. Ghosh, D. P. Goldstein and R. S. Berkowitz (2008). "The changing role of thoracotomy in gestational trophoblastic neoplasia at the New England Trophoblastic Disease Center." J Reprod Med **53**(7): 493-498.

Flood, K., J. Unterscheider, S. Daly, M. P. Geary, M. M. Kennelly, F. M. McAuliffe, K. O'Donoghue, A. Hunter, J. J. Morrison, G. Burke, P. Dicker, E. C. Tully and F. D. Malone (2014). "The role of brain sparing in the prediction of adverse outcomes in intrauterine growth restriction: results of the multicenter PORTO Study." Am J Obstet Gynecol **211**(3): 288 e281-285.

Forbes, K., M. Desforges, R. Garside, J. D. Aplin and M. Westwood (2009). "Methods for siRNA-mediated reduction of mRNA and protein expression in human placental explants, isolated primary cells and cell lines." Placenta **30**(2): 124-129.

Fouron, J. C., A. McNeal-Davidson, S. Abadir, A. Fournier, J. L. Bigras, C. Boutin, M. Brassard, M. J. Raboisson, N. van Doesburg, A. Berger, S. Brisebois and R. Gendron (2017). "Prenatal diagnosis and prognosis of accelerated idioventricular rhythm." Ultrasound Obstet Gynecol **50**(5): 624-631.

Fouron, J. C., G. Teyssier, L. Shalaby, M. Lessard and N. H. van Doesburg (1993). "Fetal central blood flow alterations in human fetuses with umbilical artery reverse diastolic flow." Am J Perinatol **10**(3): 197-207.

Frendo, J. L., D. Olivier, V. Cheynet, J. L. Blond, O. Bouton, M. Vidaud, M. Rabreau, D. Evain-Brion and F. Mallet (2003). "Direct involvement of HERV-W Env glycoprotein in human trophoblast cell fusion and differentiation." Mol Cell Biol **23**(10): 3566-3574.

Friebe-Hoffmann, U., A. Hiltmann, T. W. P. Friedl, K. Lato, R. Hammer, W. Janni and P. Kozlowski (2018). "Prenatally Diagnosed Single Umbilical Artery (SUA) - Retrospective Analysis of 1169 Fetuses." Ultraschall Med.

Froeling, F. E. and M. J. Seckl (2014). "Gestational trophoblastic tumours: an update for 2014." Curr Oncol Rep **16**(11): 408.

Gardosi, J. (1995) b. "Ethnic differences in fetal growth." Ultrasound Obstet Gynecol **6**(2): 73-74.

Gardosi, J., M. Mongelli, M. Wilcox and A. Chang (1995). "An adjustable fetal weight standard." Ultrasound Obstet Gynecol **6**(3): 168-174.

Gentric, G. and C. Desdouets (2014). "Polyploidization in liver tissue." Am J Pathol **184**(2): 322-331.

Georgiades, P., A. C. Ferguson-Smith and G. J. Burton (2002). "Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae." Placenta **23**(1): 3-19.

Golfier, F., J. Massardier, J. P. Guastalla, V. Trillet-Lenoir, L. Frappart, B. Mathian, T. Hajri, A. M. Schott and D. Raudrant (2010). "[Management of gestational trophoblastic disease]." J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) **39**(3 Suppl): F25-32.

Gomez-Lopez, N., R. Romero, B. Panaitescu, Y. Leng, Y. Xu, A. L. Tarca, J. Faro, P. Pacora, S. S. Hassan and C. D. Hsu (2018). "Inflammasome activation during spontaneous preterm labor with intra-amniotic infection or sterile intra-amniotic inflammation." Am J Reprod Immunol **80**(5): e13049.

Gouin, K., K. Murphy, P. S. Shah, W. Knowledge Synthesis group on Determinants of Low Birth and B. Preterm (2011). "Effects of cocaine use during pregnancy on low birthweight and preterm birth: systematic review and metaanalyses." Am J Obstet Gynecol **204**(4): 340 e341-312.

Grenier, J. M., L. Wang, G. A. Manji, W. J. Huang, A. Al-Garawi, R. Kelly, A. Carlson, S. Merriam, J. M. Lora, M. Briskin, P. S. DiStefano and J. Bertin (2002). "Functional screening of five PYPAF family members identifies PYPAF5 as a novel regulator of NF-kappaB and caspase-1." FEBS Lett **530**(1-3): 73-78.

Gringhuis, S. I., T. M. Kaptein, B. A. Wevers, B. Theelen, M. van der Vlist, T. Boekhout and T. B. Geijtenbeek (2012). "Dectin-1 is an extracellular pathogen sensor for the induction and processing of IL-1beta via a noncanonical caspase-8 inflammasome." Nat Immunol **13**(3): 246-254.

Haig, D. and M. Westoby (2006). "An earlier formulation of the genetic conflict hypothesis of genomic imprinting." Nat Genet **38**(3): 271.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.

Hando, T., M. Ohno and T. Kurose (1998). "Recent aspects of gestational trophoblastic disease in Japan." Int J Gynaecol Obstet **60 Suppl 1**: S71-76.

Hannan, N. J., P. Paiva, E. Dimitriadis and L. A. Salamonsen (2010). "Models for study of human embryo implantation: choice of cell lines?" Biol Reprod **82**(2): 235-245.

Harris, L. K. and J. D. Aplin (2007). "Vascular remodeling and extracellular matrix breakdown in the uterine spiral arteries during pregnancy." Reprod Sci **14**(8 Suppl): 28-34.

Hassold, T., N. Chen, J. Funkhouser, T. Jooss, B. Manuel, J. Matsuura, A. Matsuyama, C. Wilson, J. A. Yamane and P. A. Jacobs (1980). "A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions." Ann Hum Genet **44**(2): 151-178.

Hayden, M. S. and S. Ghosh (2011). "NF-kappaB in immunobiology." Cell Res **21**(2): 223-244.

Hayward, B. E., M. De Vos, N. Talati, M. R. Abdollahi, G. R. Taylor, E. Meyer, D. Williams, E. R. Maher, F. Setna, K. Nazir, S. Hussaini, H. Jafri, Y. Rashid, E. Sheridan and D. T. Bonthron (2009). "Genetic and epigenetic analysis of recurrent hydatidiform mole." Hum Mutat **30**(5): E629-639.

Horn, L. C., J. Kowalzik, K. Bilek, C. E. Richter and J. Einenkel (2006). "Prognostic value of trophoblastic proliferation in complete hydatidiform moles in predicting persistent disease." Pathol Res Pract **202**(3): 151-156.

Hoss, F., J. F. Rodriguez-Alcazar and E. Latz (2017). "Assembly and regulation of ASC specks." Cell Mol Life Sci **74**(7): 1211-1229.

Howell, M. & Sheperd, M. (2018). "The immune system." Anaesthesia & Intensive Care Medicine.

Huang, J. Y., P. H. Yu, Y. C. Li and P. L. Kuo (2017). "NLRP7 contributes to in vitro decidualization of endometrial stromal cells." Reprod Biol Endocrinol **15**(1): 66.

Hui, P., N. Buza, K. M. Murphy and B. M. Ronnett (2017). "Hydatidiform Moles: Genetic Basis and Precision Diagnosis." Annu Rev Pathol **12**: 449-485.

Huppertz, B. and J. C. Kingdom (2004). "Apoptosis in the trophoblast--role of apoptosis in placental morphogenesis." J Soc Gynecol Investig **11**(6): 353-362.

Imamura, R., Y. Wang, T. Kinoshita, M. Suzuki, T. Noda, J. Sagara, S. Taniguchi, H. Okamoto and T. Suda (2010). "Anti-inflammatory activity of PYNOD and its mechanism in humans and mice." J Immunol **184**(10): 5874-5884.

Jackson, R. A., K. A. Gibson, Y. W. Wu and M. S. Croughan (2004). "Perinatal outcomes in singletons following in vitro fertilization: a meta-analysis." Obstet Gynecol **103**(3): 551-563.

Jaddoe, V. W., R. Bakker, A. Hofman, J. P. Mackenbach, H. A. Moll, E. A. Steegers and J. C. Witteman (2007). "Moderate alcohol consumption during pregnancy and the risk of low birth weight and preterm birth. The generation R study." Ann Epidemiol **17**(10): 834-840.

Jeru, I., P. Duquesnoy, T. Fernandes-Alnemri, E. Cochet, J. W. Yu, M. Lackmy-Port-Lis, E. Grimprel, J. Landman-Parker, V. Hentgen, S. Marlin, K. McElreavey, T. Sarkisian, G. Grateau, E. S. Alnemri and S. Amselem (2008). "Mutations in NALP12 cause hereditary periodic fever syndromes." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(5): 1614-1619.

Jones, C. J. and H. Fox (1991). "Ultrastructure of the normal human placenta." Electron Microsc Rev **4**(1): 129-178.

Jorgensen, I. and E. A. Miao (2015). "Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens." Immunol Rev **265**(1): 130-142.

Judson, H., B. E. Hayward, E. Sheridan and D. T. Bonthron (2002). "A global disorder of imprinting in the human female germ line." Nature **416**(6880): 539-542.

Kaufmann, P., S. Black and B. Huppertz (2003). "Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia." Biol Reprod **69**(1): 1-7.

Khare, S., A. Dorfleutner, N. B. Bryan, C. Yun, A. D. Radian, L. de Almeida, Y. Rojanasakul and C. Stehlik (2012). "An NLRP7-containing inflammasome mediates recognition of microbial lipopeptides in human macrophages." Immunity **36**(3): 464-476.

Khong, T. Y. and W. B. Robertson (1987). "Placenta creta and placenta praevia creta." Placenta **8**(4): 399-409.

Khong, T. Y., F. De Wolf, W. B. Robertson and I. Brosens (1986). "Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants." Br J Obstet Gynaecol **93**(10): 1049-1059.

Kim, Y. K., J. S. Shin and M. H. Nahm (2016). "NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases." Yonsei Med J **57**(1): 5-14.

Kinoshita, T., C. Kondoh, M. Hasegawa, R. Imamura and T. Suda (2006). "Fas-associated factor 1 is a negative regulator of PYRIN-containing Apaf-1-like protein 1." Int Immunol **18**(12): 1701-1706.

Kinoshita, T., Y. Wang, M. Hasegawa, R. Imamura and T. Suda (2005). "PYPAF3, a PYRIN-containing APAF-1-like protein, is a feedback regulator of caspase-1-dependent interleukin-1beta secretion." J Biol Chem **280**(23): 21720-21725.

Knight, M. N., M. Tuffnell, D. et al (2017). "Saving lives, Improving Mother's Care - Lessons Learned to Inform Maternity Care from the UK and Ireland Confidential Enquiries into Maternal Deaths an Morbidity 2013-15." Notional Perinatal Epidemiology, University of Oxford, Oxford.

Kohli, S., S. Ranjan, J. Hoffmann, M. Kashif, E. A. Daniel, M. M. Al-Dabet, F. Bock, S. Nazir, H. Huebner, P. R. Mertens, K. D. Fischer, A. C. Zenclussen, S. Offermanns, A. Aharon, B. Brenner, K. Shahzad, M. Ruebner and B. Isermann (2016). "Maternal extracellular vesicles and platelets promote preeclampsia via inflammasome activation in trophoblasts." Blood **128**(17): 2153-2164.

Kou, Y. C., L. Shao, H. H. Peng, R. Rosetta, D. del Gaudio, A. F. Wagner, T. K. Al-Hussaini and I. B. Van den Veyver (2008). "A recurrent intragenic genomic duplication, other novel mutations in NLRP7 and imprinting defects in recurrent biparental hydatidiform moles." Mol Hum Reprod **14**(1): 33-40.

Kovo, M., L. Schreiber, A. Ben-Haroush, G. Cohen, E. Weiner, A. Golan and J. Bar (2013). "The placental factor in early- and late-onset normotensive fetal growth restriction." Placenta **34**(4): 320-324.

Kramer, M. S. (2003). "The epidemiology of adverse pregnancy outcomes: an overview." J Nutr **133**(5 Suppl 2): 1592S-1596S.

Kuemmerle-Deschner, J. B., F. Hofer, T. Endres, B. Kortus-Goetze, N. Blank, E. Weissbarth-Riedel, C. Schuetz, T. Kallinich, K. Krause, C. Rietschel, G. Horneff and S. M. Benseler (2016). "Real-life effectiveness of canakinumab in cryopyrin-associated periodic syndrome." Rheumatology (Oxford) **55**(4): 689-696.

Kuemmerle-Deschner, J. B., S. Ozen, P. N. Tyrrell, I. Kone-Paut, R. Goldbach-Mansky, H. Lachmann, N. Blank, H. M. Hoffman, E. Weissbarth-Riedel, B. Hugle, T. Kallinich, M. Gattorno, A. Gul, N. Ter Haar, M. Oswald, F. Dedeoglu, L. Cantarini and S. M. Benseler (2017). "Diagnostic criteria for cryopyrin-associated periodic syndrome (CAPS)." Ann Rheum Dis **76**(6): 942-947.

Langbein, M., R. Strick, P. L. Strissel, N. Vogt, H. Parsch, M. W. Beckmann and R. L. Schild (2008). "Impaired cytotrophoblast cell-cell fusion is associated with reduced Syncytin and increased apoptosis in patients with placental dysfunction." Mol Reprod Dev **75**(1): 175-183.

Langer, O., J. Levy, L. Brustman, A. Anyaegbunam, R. Merkatz and M. Divon (1989). "Glycemic control in gestational diabetes mellitus--how tight is tight enough: small for gestational age versus large for gestational age?" Am J Obstet Gynecol **161**(3): 646-653.

Lee, X., J. C. Keith, Jr., N. Stumm, I. Moutsatsos, J. M. McCoy, C. P. Crum, D. Genest, D. Chin, C. Ehrenfels, R. Pijnenborg, F. A. van Assche and S. Mi (2001). "Downregulation of placental syncytin expression and abnormal protein localization in pre-eclampsia." Placenta **22**(10): 808-812.

Lees, C., N. Marlow, B. Arabin, C. M. Bilardo, C. Brezinka, J. B. Derks, J. Duvekot, T. Frusca, A. Diemert, E. Ferrazzi, W. Ganzevoort, K. Hecher, P. Martinelli, E. Ostermayer, A. T. Papageorghiou, D. Schlembach, K. T. Schneider, B. Thilaganathan, T. Todros, A. van Wassenaer-Leemhuis, A. Valcamonico, G. H. Visser, H. Wolf and T. Group (2013). "Perinatal morbidity and mortality in early-onset fetal growth restriction: cohort outcomes of the trial of randomized umbilical and fetal flow in Europe (TRUFFLE)." Ultrasound Obstet Gynecol **42**(4): 400-408.

Li, L., B. Baibakov and J. Dean (2008). "A subcortical maternal complex essential for preimplantation mouse embryogenesis." Dev Cell **15**(3): 416-425.

Li, X., M. Ito, F. Zhou, N. Youngson, X. Zuo, P. Leder and A. C. Ferguson-Smith (2008) b. "A maternal-zygotic effect gene, Zfp57, maintains both maternal and paternal imprints." Dev Cell **15**(4): 547-557.

Louwen, F., C. Muschol-Steinmetz, J. Reinhard, A. Reitter and J. Yuan (2012). "A lesson for cancer research: placental microarray gene analysis in preeclampsia." Oncotarget **3**(8): 759-773.

Lu, X. and Y. Kang (2009). "Cell fusion as a hidden force in tumor progression." Cancer Res **69**(22): 8536-8539.

Lurain, J. R. (2011). "Gestational trophoblastic disease II: classification and management of gestational trophoblastic neoplasia." Am J Obstet Gynecol **204**(1): 11-18.

Mahadevan, S., S. Wen, Y. W. Wan, H. H. Peng, S. Otta, Z. Liu, M. Iacovino, E. M. Mahen, M. Kyba, B. Sadikovic and I. B. Van den Veyver (2014). "NLRP7 affects trophoblast lineage differentiation, binds to overexpressed YY1 and alters CpG methylation." Hum Mol Genet **23**(3): 706-716.

Maltepe, E., A. I. Bakardjiev and S. J. Fisher (2010). "The placenta: transcriptional, epigenetic, and physiological integration during development." J Clin Invest **120**(4): 1016-1025.

Man, S. M. and T. D. Kanneganti (2016). "Converging roles of caspases in inflammasome activation, cell death and innate immunity." Nat Rev Immunol **16**(1): 7-21.

Manji, G. A., L. Wang, B. J. Geddes, M. Brown, S. Merriam, A. Al-Garawi, S. Mak, J. M. Lora, M. Briskin, M. Jurman, J. Cao, P. S. DiStefano and J. Bertin (2002). "PYPAF1, a PYRIN-containing Apaf1-like protein that assembles with ASC and regulates activation of NF-kappa B." J Biol Chem **277**(13): 11570-11575.

Martinon, F., K. Burns and J. Tschopp (2002). "The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta." Mol Cell **10**(2): 417-426.

Matias, M. L., M. Romao, I. C. Weel, V. R. Ribeiro, P. R. Nunes, V. T. Borges, J. P. Araujo, Jr., J. C. Peracoli, L. de Oliveira and M. T. Peracoli (2015). "Endogenous and Uric Acid-Induced Activation of NLRP3 Inflammasome in Pregnant Women with Preeclampsia." PLoS One **10**(6): e0129095.

Matsuura, J., D. Chiu, P. A. Jacobs and A. E. Szulman (1984). "Complete hydatidiform mole in Hawaii: an epidemiological study." Genet Epidemiol **1**(3): 271-284.

McCowan, L. and R. P. Horgan (2009). "Risk factors for small for gestational age infants." Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol **23**(6): 779-793.

McCowan, L. M., G. A. Dekker, E. Chan, A. Stewart, L. C. Chappell, M. Hunter, R. Moss-Morris, R. A. North and S. consortium (2009) b. "Spontaneous preterm birth and small for gestational age infants in women who stop smoking early in pregnancy: prospective cohort study." BMJ **338**: b1081.

Messaed, C., E. Akoury, U. Djuric, J. Zeng, M. Saleh, L. Gilbert, M. Seoud, S. Qureshi and R. Slim (2011). "NLRP7, a nucleotide oligomerization domain-like receptor protein, is required for normal cytokine secretion and co-localizes with Golgi and the microtubule-organizing center." J Biol Chem **286**(50): 43313-43323.

Mi, S., X. Lee, X. Li, G. M. Veldman, H. Finnerty, L. Racie, E. LaVallie, X. Y. Tang, P. Edouard, S. Howes, J. C. Keith, Jr. and J. M. McCoy (2000). "Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis." Nature **403**(6771): 785-789.

Mihu, C. M., S. Susman, D. Rus Ciuca, D. Mihu and N. Costin (2009). "Aspects of placental morphogenesis and angiogenesis." Rom J Morphol Embryol **50**(4): 549-557.

Modi, B. P., M. E. Teves, L. N. Pearson, H. I. Parikh, P. Chaemsaithong, N. U. Sheth, T. P. York, R. Romero and J. F. Strauss, 3rd (2017). "Rare mutations and potentially damaging missense variants in genes encoding fibrillar collagens and proteins involved in their production are candidates for risk for preterm premature rupture of membranes." PLoS One **12**(3): e0174356.

Mohr, M., K. S. Zaenker and T. Dittmar (2015). "Fusion in cancer: an explanatory model for aneuploidy, metastasis formation, and drug resistance." Methods Mol Biol **1313**: 21-40.

Monk, D. (2015). "Germline-derived DNA methylation and early embryo epigenetic reprogramming: The selected survival of imprints." Int J Biochem Cell Biol **67**: 128-138.

Monk, D., M. Sanchez-Delgado and R. Fisher (2017). "NLRPs, the subcortical maternal complex and genomic imprinting." Reproduction **154**(6): R161-R170.

Morton, J. S., C. L. Cooke and S. T. Davidge (2016). "In Utero Origins of Hypertension: Mechanisms and Targets for Therapy." Physiol Rev **96**(2): 549-603.

Mullen, C. A. (1998). "Review: analogies between trophoblastic and malignant cells." Am J Reprod Immunol **39**(1): 41-49.

Murdoch, S., U. Djuric, B. Mazhar, M. Seoud, R. Khan, R. Kuick, R. Bagga, R. Kircheisen, A. Ao, B. Ratti, S. Hanash, G. A. Rouleau and R. Slim (2006). "Mutations in NALP7 cause recurrent hydatidiform moles and reproductive wastage in humans." Nat Genet **38**(3): 300-302.

Neubauer, N. L., N. Latif, K. Kalakota, M. Marymont, W. Small, Jr., J. C. Schink and J. R. Lurain (2012). "Brain metastasis in gestational trophoblastic neoplasia: an update." J Reprod Med **57**(7-8): 288-292.

Newlands, E. S., L. Holden, M. J. Seckl, I. McNeish, S. Strickland and G. J. Rustin (2002). "Management of brain metastases in patients with high-risk gestational trophoblastic tumors." J Reprod Med **47**(6): 465-471.

Nguyen, N. M. and R. Slim (2014). "Genetics and Epigenetics of Recurrent Hydatidiform Moles: Basic Science and Genetic Counselling." Curr Obstet Gynecol Rep **3**: 55-64.

Noal, S., F. Joly and E. Leblanc (2010). "[Management of gestational trophoblastic disease]." Gynecol Obstet Fertil **38**(3): 193-198.

Norwitz, E. R., D. J. Schust and S. J. Fisher (2001). "Implantation and the survival of early pregnancy." N Engl J Med **345**(19): 1400-1408.

Ochiai, D., K. Nakamura, T. Sakurai, T. Ikeda, K. Yakubo and T. Fukuiya (2012). "Atypical severe preeclampsia superimposed on chronic hypertension without molar change at 19 weeks of gestation: a case report." Arch Gynecol Obstet **286**(5): 1329-1330.

Ogren, L. & Talamantes, F. (1994). " The placenta as an endocrine organ: polypeptides." Knobil E, Neill JD, eds. The Physiology of Reproduction. **2nd ed. New York: Raven Press;**: 875-945.

Ohno, S., T. Kinoshita, Y. Ohno, T. Minamoto, N. Suzuki, M. Inoue and T. Suda (2008). "Expression of NLRP7 (PYPAF3, NALP7) protein in endometrial cancer tissues." Anticancer Res **28**(4C): 2493-2497.

Okada, K., E. Hirota, Y. Mizutani, T. Fujioka, T. Shuin, T. Miki, Y. Nakamura and T. Katagiri (2004). "Oncogenic role of NALP7 in testicular seminomas." Cancer Sci **95**(12): 949-954.

Osathanondh, R., R. S. Berkowitz, C. de Cholnoky, B. S. Smith, D. P. Goldstein and J. E. Tyson (1986). "Hormonal measurements in patients with theca lutein cysts and gestational trophoblastic disease." J Reprod Med **31**(3): 179-183.

Parry, D. A., C. V. Logan, B. E. Hayward, M. Shires, H. Landolsi, C. Diggle, I. Carr, C. Rittore, I. Touitou, L. Philibert, R. A. Fisher, M. Fallahian, J. D. Huntriss, H. M. Picton, S. Malik, G. R. Taylor, C. A. Johnson, D. T. Bonthron and E. G. Sheridan (2011). "Mutations causing familial biparental hydatidiform mole implicate c6orf221 as a possible regulator of genomic imprinting in the human oocyte." Am J Hum Genet **89**(3): 451-458.

Perkins, N. D. (2012). "The diverse and complex roles of NF-kappaB subunits in cancer." Nat Rev Cancer **12**(2): 121-132.

Pijnenborg, R., J. M. Bland, W. B. Robertson and I. Brosens (1983). "Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy." Placenta **4**(4): 397-413.

Qian, J., C. Deveault, R. Bagga, X. Xie and R. Slim (2007). "Women heterozygous for NALP7/NLRP7 mutations are at risk for reproductive wastage: report of two novel mutations." Hum Mutat **28**(7): 741.

Qu, X., G. Zhuang, L. Yu, G. Meng and N. Ferrara (2012). "Induction of Bv8 expression by granulocyte colony-stimulating factor in CD11b+Gr1+ cells: key role of Stat3 signaling." J Biol Chem **287**(23): 19574-19584.

Radian, A. D., L. de Almeida, A. Dorfleutner and C. Stehlik (2013). "NLRP7 and related inflammasome activating pattern recognition receptors and their function in host defense and disease." Microbes Infect **15**(8-9): 630-639.

Radian, A. D., S. Khare, L. H. Chu, A. Dorfleutner and C. Stehlik (2015). "ATP binding by NLRP7 is required for inflammasome activation in response to bacterial lipopeptides." Mol Immunol **67**(2 Pt B): 294-302.

Rai, A. and J. C. Cross (2014). "Development of the hemochorial maternal vascular spaces in the placenta through endothelial and vasculogenic mimicry." Dev Biol **387**(2): 131-141.

Rajagopalan, R., S. K. Ranjan and C. K. Nair (2003). "Effect of vinblastine sulfate on gamma-radiation-induced DNA single-strand breaks in murine tissues." Mutat Res **536**(1-2): 15-25.

Ramathal, C. Y., I. C. Bagchi, R. N. Taylor and M. K. Bagchi (2010). "Endometrial decidualization: of mice and men." Semin Reprod Med **28**(1): 17-26.

Ramsey, P. S., J. T. Van Winter, T. A. Gaffey and K. D. Ramin (1998). "Eclampsia complicating hydatidiform molar pregnancy with a coexisting, viable fetus. A case report." J Reprod Med **43**(5): 456-458.

Rao, K. P., V. Belogolovkin, J. Yankowitz and J. A. Spinnato, 2nd (2012). "Abnormal placentation: evidence-based diagnosis and management of placenta previa, placenta accreta, and vasa previa." Obstet Gynecol Surv **67**(8): 503-519.

Redman, C. W. (1991). "Current topic: pre-eclampsia and the placenta." Placenta **12**(4): 301-308.

Redman, C. W. (1997). "Cytotrophoblasts: masters of disguise." Nat Med **3**(6): 610-611.

Renaud, S. J., T. Cotechini, J. S. Quirt, S. K. Macdonald-Goodfellow, M. Othman and C. H. Graham (2011). "Spontaneous pregnancy loss mediated by abnormal maternal inflammation in rats is linked to deficient uteroplacental perfusion." J Immunol **186**(3): 1799-1808.

Roberts, J. M., C. W. G. Redman and C. Global Pregnancy (2017). "Global Pregnancy Collaboration symposium: Prepregnancy and very early pregnancy antecedents of adverse pregnancy outcomes: Overview and recommendations." Placenta **60**: 103-109.

Rodrigues, F., V. Hentgen, C. Bachmeyer, I. Kone-Paut, A. Belot, G. Grateau, G. Sarrabay and S. Georgin-Lavialle (2018). "[NLRC4 associated autoinflammatory diseases: A systematic review of the current literature]." Rev Med Interne **39**(4): 279-286.

Rojas-Arias, J. L., L. D. Ortiz-Lopez, W. J. Orduna-Aparicio, C. A. Quintero-Loaiza, E. Acuna-Osorio, A. Franco-Hernandez, M. Parra-Saavedra, S. Molina-Giraldo and F. Figueras (2015). "Characterization of Atypical Preeclampsia." Fetal Diagn Ther **38**(2): 119-125.

Romberg, N., K. Al Moussawi, C. Nelson-Williams, A. L. Stiegler, E. Loring, M. Choi, J. Overton, E. Meffre, M. K. Khokha, A. J. Huttner, B. West, N. A. Podoltsev, T. J. Boggon, B. I. Kazmierczak and R. P. Lifton (2014). "Mutation of NLRC4 causes a syndrome of enterocolitis and autoinflammation." Nat Genet **46**(10): 1135-1139.

Rosenberg, A. (2008). "The IUGR newborn." Semin Perinatol **32**(3): 219-224.

Rote, N. S. and B. P. Stetzer (2003). "Autoimmune disease as a cause of reproductive failure." Clin Lab Med **23**(2): 265-293.

Sand, P. K., J. R. Lurain and J. I. Brewer (1984). "Repeat gestational trophoblastic disease." Obstet Gynecol **63**(2): 140-144.

Sebire, N. J., H. Rees, F. Paradinas, M. Seckl and E. Newlands (2001). "The diagnostic implications of routine ultrasound examination in histologically confirmed early molar pregnancies." Ultrasound Obstet Gynecol **18**(6): 662-665.

Seckl, M. J., N. J. Sebire and R. S. Berkowitz (2010). "Gestational trophoblastic disease." Lancet **376**(9742): 717-729.

Seckl, M. J., N. J. Sebire, R. A. Fisher, F. Golfier, L. Massuger, C. Sessa and E. G. W. Group (2013). "Gestational trophoblastic disease: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up." Ann Oncol **24 Suppl 6**: vi39-50.

Sehgal, A., J. E. Dahlstrom, Y. Chan, B. J. Allison, S. L. Miller and G. R. Polglase (2018). "Placental histopathology in preterm fetal growth restriction." J Paediatr Child Health.

Shang, E. R. (1982). "[A retrospective investigation on the incidence of hydatidiform mole in 20,548 fertile women]." Zhonghua Yi Xue Za Zhi **62**(5): 282-285.

Shibuya, M. (2011). "Involvement of Flt-1 (VEGF receptor-1) in cancer and preeclampsia." Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci **87**(4): 167-178.

Shrivastava, S., A. C. Kataki, D. Barmon, P. Deka, C. Bhuyan and S. J. Bhargav (2014). "Gestational trophoblastic neoplasia: A 6 year retrospective study." South Asian J Cancer **3**(1): 33-37.

Sibai, B. M. and C. L. Stella (2009). "Diagnosis and management of atypical preeclampsia-eclampsia." Am J Obstet Gynecol **200**(5): 481 e481-487.

Sibai, B. M., D. L. Watson, G. A. Hill, J. A. Spinnato and G. D. Anderson (1983). "Maternal-fetal correlations in patients with severe preeclampsia/eclampsia." Obstet Gynecol **62**(6): 745-750.

Silver, R. M. (2015). "Abnormal Placentation: Placenta Previa, Vasa Previa, and Placenta Accreta." Obstet Gynecol **126**(3): 654-668.

Singer, H., A. Biswas, N. Nuesgen, J. Oldenburg and O. El-Maarri (2015). "NLRP7, Involved in Hydatidiform Molar Pregnancy (HYDM1), Interacts with the Transcriptional Repressor ZBTB16." PLoS One **10**(6): e0130416.

Singer, H., A. Biswas, N. Zimmer, C. Messaed, J. Oldenburg, R. Slim and O. El-Maarri (2014). "NLRP7 inter-domain interactions: the NACHT-associated domain is the physical mediator for oligomeric assembly." Mol Hum Reprod **20**(10): 990-1001.

Slim, R., Khawajkie, Yassemine, Rahimi, Kurosh, and Sauthier, Philippe (2017). "Genetics and Epigenetics of Hydatidiform Moles." In: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. http://www.els.net

Soellner, L., K. M. Kopp, S. Mutze, R. Meyer, M. Begemann, S. Rudnik, W. Rath, T. Eggermann and K. Zerres (2018). "NLRP genes and their role in preeclampsia and multi-locus imprinting disorders." J Perinat Med **46**(2): 169-173.

Soeters, P. B. and R. F. Grimble (2013). "The conditional role of inflammation in pregnancy and cancer." Clin Nutr **32**(3): 460-465.

Sones, J. L. and R. L. Davisson (2016). "Preeclampsia, of mice and women." Physiol Genomics **48**(8): 565-572.

Stodle, G. S., G. B. Silva, L. H. Tangeras, L. M. Gierman, I. Nervik, U. E. Dahlberg, C. Sun, M. H. Aune, L. C. V. Thomsen, L. Bjorge and A. C. Iversen (2018). "Placental inflammation in pre-eclampsia by Nod-like receptor protein (NLRP)3 inflammasome activation in trophoblasts." Clin Exp Immunol **193**(1): 84-94.

Strick, R., S. Ackermann, M. Langbein, J. Swiatek, S. W. Schubert, S. Hashemolhosseini, T. Koscheck, P. A. Fasching, R. L. Schild, M. W. Beckmann and P. L. Strissel (2007). "Proliferation and cell-cell fusion of endometrial carcinoma are induced by the human endogenous retroviral Syncytin-1 and regulated by TGF-beta." J Mol Med (Berl) **85**(1): 23-38.

Strissel, P. L., M. Ruebner, F. Thiel, D. Wachter, A. B. Ekici, F. Wolf, F. Thieme, K. Ruprecht, M. W. Beckmann and R. Strick (2012). "Reactivation of codogenic endogenous retroviral (ERV) envelope genes in human endometrial carcinoma and prestages: Emergence of new molecular targets." Oncotarget **3**(10): 1204-1219.

Szarka, A., J. Rigo, Jr., L. Lazar, G. Beko and A. Molvarec (2010). "Circulating cytokines, chemokines and adhesion molecules in normal pregnancy and preeclampsia determined by multiplex suspension array." BMC Immunol **11**: 59.

Takeuchi, S. (1987). "Incidence of gestational trophoblastic disease by regional registration in Japan." Hum Reprod **2**(8): 729-734.

Tan, M. S., J. T. Yu, T. Jiang, X. C. Zhu, H. F. Wang, W. Zhang, Y. L. Wang, W. Jiang and L. Tan (2013). "NLRP3 polymorphisms are associated with late-onset Alzheimer's disease in Han Chinese." J Neuroimmunol **265**(1-2): 91-95.

Tao, Y., V. Pinzi, J. Bourhis and E. Deutsch (2007). "Mechanisms of disease: signaling of the insulin-like growth factor 1 receptor pathway--therapeutic perspectives in cancer." Nat Clin Pract Oncol **4**(10): 591-602.

Tashiro, F., M. Kanai-Azuma, S. Miyazaki, M. Kato, T. Tanaka, S. Toyoda, E. Yamato, H. Kawakami, T. Miyazaki and J. Miyazaki (2010). "Maternal-effect gene Ces5/Ooep/Moep19/Floped is essential for oocyte cytoplasmic lattice formation and embryonic development at the maternal-zygotic stage transition." Genes Cells **15**(8): 813-828.

Tian, X., G. Pascal and P. Monget (2009). "Evolution and functional divergence of NLRP genes in mammalian reproductive systems." BMC Evol Biol **9**: 202.

Tideman, E., K. Marsal and D. Ley (2007). "Cognitive function in young adults following intrauterine growth restriction with abnormal fetal aortic blood flow." Ultrasound Obstet Gynecol **29**(6): 614-618.

Tong, Z. B., L. Gold, K. E. Pfeifer, H. Dorward, E. Lee, C. A. Bondy, J. Dean and L. M. Nelson (2000). "Mater, a maternal effect gene required for early embryonic development in mice." Nat Genet **26**(3): 267-268.

Traboulsi, W., F. Sergent, H. Boufettal, S. Brouillet, R. Slim, P. Hoffmann, M. Benlahfid, Q. Y. Zhou, G. Balboni, V. Onnis, P. A. Bolze, A. Salomon, P. Sauthier, F. Mallet, T. Aboussaouira, J. J. Feige, M. Benharouga and N. Alfaidy (2017). "Antagonism of EG-VEGF Receptors as Targeted Therapy for Choriocarcinoma Progression In Vitro and In Vivo." Clin Cancer Res **23**(22): 7130-7140.

Tranquilli, A. L. (2014). "Prediction, medical illness and the risk of pre-eclampsia." Pregnancy Hypertens **4**(3): 245.

Tseng, J. J., S. L. Hsu, M. C. Wen, E. S. Ho and M. M. Chou (2004). "Expression of epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 oncoprotein in trophoblast populations of placenta accreta." Am J Obstet Gynecol **191**(6): 2106-2113.

Vicovac, L. and J. D. Aplin (1996). "Epithelial-mesenchymal transition during trophoblast differentiation." Acta Anat (Basel) **156**(3): 202-216.

Vignery, A. (2005). "Macrophage fusion: the making of osteoclasts and giant cells." J Exp Med **202**(3): 337-340.

Wallace, D. C., U. Surti, C. W. Adams and A. E. Szulman (1982). "Complete moles have paternal chromosomes but maternal mitochondrial DNA." Hum Genet **61**(2): 145-147.

Wang, C. M., P. H. Dixon, S. Decordova, M. D. Hodges, N. J. Sebire, S. Ozalp, M. Fallahian, A. Sensi, F. Ashrafi, V. Repiska, J. Zhao, Y. Xiang, P. M. Savage, M. J. Seckl and R. A. Fisher (2009). "Identification of 13 novel NLRP7 mutations in 20 families with recurrent hydatidiform mole; missense mutations cluster in the leucine-rich region." J Med Genet **46**(8): 569-575.

Wang, L., G. A. Manji, J. M. Grenier, A. Al-Garawi, S. Merriam, J. M. Lora, B. J. Geddes, M. Briskin, P. S. DiStefano and J. Bertin (2002). "PYPAF7, a novel PYRIN-containing Apaf1-like protein that regulates activation of NF-kappa B and caspase-1-dependent cytokine processing." J Biol Chem **277**(33): 29874-29880.

Wright, E., M. C. Audette, X. Y. Ye, S. Keating, B. Hoffman, S. J. Lye, P. S. Shah and J. C. Kingdom (2017). "Maternal Vascular Malperfusion and Adverse Perinatal Outcomes in Low-Risk Nulliparous Women." Obstet Gynecol **130**(5): 1112-1120.

Yang, J. and R. A. Weinberg (2008). "Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis." Dev Cell **14**(6): 818-829.

Yeaton-Massey, A. L., J.D. (2014). "Placenta Accreta: An Increasingly Common Problem." **15**(7): 275-285.Yu, X. J., Z. Yi, Z. Gao, D. Qin, Y. Zhai, X. Chen, Y. Ou-Yang, Z. B. Wang, P. Zheng, M. S. Zhu, H. Wang, Q. Y. Sun, J. Dean and L. Li (2014). "The subcortical maternal complex controls symmetric division of mouse zygotes by regulating F-actin dynamics." Nat Commun **5**: 4887.

Yzydorczyk, C., J. B. Armengaud, A. C. Peyter, H. Chehade, F. Cachat, C. Juvet, B. Siddeek, S. Simoncini, F. Sabatier, F. Dignat-George, D. Mitanchez and U. Simeoni (2017). "Endothelial dysfunction in individuals born after fetal growth restriction: cardiovascular and renal consequences and preventive approaches." J Dev Orig Health Dis **8**(4): 448-464.

Zhang, P., M. Dixon, M. Zucchelli, F. Hambiliki, L. Levkov, O. Hovatta and J. Kere (2008). "Expression analysis of the NLRP gene family suggests a role in human preimplantation development." PLoS One **3**(7): e2755.

Zhao, H., M. Ozen, R. J. Wong and D. K. Stevenson (2014). "Heme oxygenase-1 in pregnancy and cancer: similarities in cellular invasion, cytoprotection, angiogenesis, and immunomodulation." Front Pharmacol **5**: 295.

Zhong, F. L., O. Mamai, L. Sborgi, L. Boussofara, R. Hopkins, K. Robinson, I. Szeverenyi, T. Takeichi, R. Balaji, A. Lau, H. Tye, K. Roy, C. Bonnard, P. J. Ahl, L. A. Jones, P. J. Baker, L. Lacina, A. Otsuka, P. R. Fournie, F. Malecaze, E. B. Lane, M. Akiyama, K. Kabashima, J. E. Connolly, S. L. Masters, V. J. Soler, S. S. Omar, J. A. McGrath, R. Nedelcu, M. Gribaa, M. Denguezli, A. Saad, S. Hiller and B. Reversade (2016). "Germline NLRP1 Mutations Cause Skin Inflammatory and Cancer Susceptibility Syndromes via Inflammasome Activation." Cell **167**(1): 187-202 e117.

Zhou, W., J. D. Li, W. P. Hu, M. Y. Cheng and Q. Y. Zhou (2012). "Prokineticin 2 is involved in the thermoregulation and energy expenditure." Regul Pept **179**(1-3): 84-90.

Zhou, Y., S. J. Fisher, M. Janatpour, O. Genbacev, E. Dejana, M. Wheelock and C. H. Damsky (1997). "Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion?" J Clin Invest **99**(9): 2139-2151.

Zhu, J. Y. P., Z.J. & Yu, Y.H (2012). "Regulation of trophoblast invasion: the role of matrix metalloproteinases." Reviews in Obstetrics & Gynecology **5**(3-4): 137-143.

Annexes

Annexe 1 : Liste des communications scientifiques

Communications affichées

- Communication sous forme de **poster** au 4e congrès du Groupe de la Francophonie Placentaire 2015, Genève, Suisse.

  Prokineticin Receptor's antagonism effects during mouse pregnancy.

  D. Reynaud, F. Sergent, F. Balboni, QY. Zhou, JJ. Feige & N. Alfaidy.

- Communication sous forme de **poster** au congrès annuel du Cancéropôle Lyon-Auvergne-Rhône-Alpes 2017, **Lyon**, France. **Lauréats du prix Poster**

  Characterization of NLRP7 expression and regulation in normal and tumor human placentation during the first trimester of pregnancy.

  R. Abi Nahed*, D. Reynaud*, A. Wetzel, W. Traboulsi, M. Benharouga, T. Aboussaouira & N. Alfaidy. * Equal contribution

- Communication sous forme de **poster** au congrès annuel du G2L2 2017, **Lyon**, France.

  Characterization of NLRP7 protein in normal and tumor pregnancies: case of Choriocarcinoma.

  D. Reynaud, R. Abi Nahed, W. Traboulsi, T. Aboussaouira, M. Benharouga & N. Alfaidy.

- Communication sous forme de **poster** au congrès annuel du G2L2 2017, **Lyon**, France. **Lauréats du Prix Poster**

  NLRP7 expression in normal and IUGR pregnancies: Physiological and physio-pathological implications.

  R. Abi Nahed, D. Reynaud, S. Ndagijimana, W. Traboulsi, M. Benharouga & N. Alfaidy.

- Communication sous forme de **poster** au congrès annuel de l'IFPA 2017, **Manchester**, Angleterre. **Prix Jeune Chercheur**

  NLRP7 expression in normal and IUGR pregnancies: Physiological and physio-pathological implications.

  R. Abi Nahed, D. Reynaud, S. Ndagijimana, W. Traboulsi, M-N. Dieudonné, P. Hoffmann, M. Benharouga & N. Alfaidy.

- Communication sous forme de **poster** au congrès annuel de la Société Française d'Endocrinologie 2018, **Nancy**, France. **Lauréats du prix Poster**

  Characterization of NLRP7 protein in normal and tumor pregnancies: case of Choriocarcinoma.

  D. Reynaud, R. Abi Nahed, W. Traboulsi, T. Aboussaouira, M. Benharouga & N. Alfaidy.

Communications orales

- Communication **orale** au 6e congrès du Groupe de la Francophonie Placentaire 2017, **Grenoble**, France. **Membre du comité d'organisation**

  NLRP7 expression in normal and FGR pregnancies.

  R. Abi Nahed, D. Reynaud, S. Ndagijimana, W. Traboulsi, M-N. Dieudonné, P. Hoffmann, M. Benharouga & N. Alfaidy.

- Communication **orale** au 6e congrès du Groupe de la Francophonie Placentaire 2017, **Grenoble**, France. **Membre du comité d'organisation**

  NLRP7 role in normal and tumor pregnancy: Case of Choriocarcinoma.

  D. Reynaud, R. Abi Nahed, W. Traboulsi, T. Aboussaouira, M. Benharouga & N. Alfaidy.

- Communication **orale** à la journée annuelle de l'école doctorale chimie et sciences du vivant 2017 (JAD2K17), **Grenoble**, France**. Lauréate du prix de la meilleure présentation orale**

  Characterization of NLRP7 protein in normal and tumor pregnancies: case of Choriocarcinoma.

  D. Reynaud, R. Abi Nahed, W. Traboulsi, T. Aboussaouira, M. Benharouga & N. Alfaidy

Publications

- **Reynaud D., Sergent F., Abi Nahed R., Brouillet S., Benharouga M. & Alfaidy N.** (2018) *EG-VEGF Maintenance Over Early Gestation to Develop a Pregnancy-Induced Hypertensive Animal Model*. In: Murthi P., Vaillancourt C. (editors). Preeclampsia. Methods in Molecular Biology, vol 1710. Humana Press, New York, NY

- **Abi Nahed R., Reynaud D., Borg AJ., Traboulsi W., Wetzel A., Sapin V., Brouillet S., Dieudonné MN., Dakoune-Guidicelli M., Benharouga M., Murthi P. & Alfaidy N.**

  Critical role of NLRP7 in trophoblast differentiation: Case of fetal growth restriction.

  En revision dans : Journal of Molecular Medicine.

- **Alfaidy N.*, Baron C.*, Reynaud D., Traboulsi W., Gueniffey A., Lamotte A., Melloul E., Dunand-Faure C., Villaret L., Bessonnat J., Mauroy C., Coutton C., Martinez G., Feige JJ., Hoffmann P., Hennebicq S. & Brouillet S.** * Equal contribution

  PROK1 is a new actor in oocyte competence: expression and hormonal regulation throughout late folliculogenesis.

  Soumis dans : Fertility and Sterility.

- **D. Reynaud, R. Abi Nahed, PA. Bolze, F. Sergent, R. Slim, O. Cochet, H. Boufettal, M. Benlahfid, T. Aboussaouira, M. Lavergne, V. Sapin, M. Benharouga & N. Alfaidy.**

  NLRP7 inflammasome promotes placental choriocarcinoma growth in vitro and in vivo.

  En préparation

- **Abi Nahed R., Reynaud D., Lartigue S., Roelants C., Vaiman D., Benharouga M., Cochet C., Filhol O*. & Alfaidy N*.** *Equal contribution

  Casein Kinase 2 contributes to trophoblast invasion: physiological and pathological implications.

  En préparation

- **D. Reynaud*, F. Sergent*, V. Kieu, D. Nguyen Viet, QY. Zhou, G. Balboni, D. Vaiman, M. Benharouga & N. Alfaidy**. * Equal contribution

  Antagonism of EG-VEGF Receptors as Targeted Therapy for Preeclampsia: *In Vitro* and *In Vivo*.

  En préparation

Annexe 2 : Article 3

EG-VEGF maintenance over early gestation to develop a Pregnancy-Induced Hypertension animal model

Je suis premier auteur de ce chapître paru dans le livre « Preeclampsia, *Methods and Protocols* », redigé par les Dr P. Murthi et C. Vaillancourt. J'y détaille le protocole technique mis au point au sein de notre groupe afin de développer un modèle murin d'hypertension tension artérielle gravidique observé notament en cas de prééclampsie.

Chapter 25

EG-VEGF Maintenance Over Early Gestation to Develop a Pregnancy-Induced Hypertensive Animal Model

Déborah Reynaud, Frédéric Sergent, Roland Abi Nahed, Sophie Brouillet, Mohamed Benharouga, and Nadia Alfaidy

Abstract

During the last decade, multiple animal models have been developed to mimic hallmarks of pregnancy-induced hypertension (PIH) diseases, which include gestational hypertension, preeclampsia (PE), or eclampsia. Converging in vitro, ex vivo, and clinical studies from our group strongly suggested the potential involvement of the new angiogenic factor EG-VEGF (endocrine gland-derived-VEGF) in the development of PIH. Here, we described the protocol that served to demonstrate that maintenance of EG-VEGF production over 11.5 days post coitus (dpc) in the gravid mice caused the development of PIH. The developed model exhibited most hallmarks of preeclampsia.

Key words Animal model, Preeclampsia, Pregnancy, EG-VEGF, Placenta, Hypertension, Glomerulosclerosis, Invasion

1 Introduction

One of the major contributing factors to the development of PIH is the failure of the extravillous trophoblast cell (EVT) to invade deep into the maternal decidua, compromising the normal establishment of the feto-maternal circulation [1]. Failure in the invasion process results in reduced placental perfusion [2], increased trophoblast apoptosis [3], and abnormal production of anti-angiogenic factors such as soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) and soluble endoglin (sEng) by the placenta [4]. These two anti-angiogenic factors are known to directly affect kidney function as well as maternal vascular system [4]. Anti-angiogenic factors are proposed to diagnose preeclampsia (PE) onset by mid second trimester of pregnancy [4, 5]. Nevertheless, early biomarkers of PE diagnosis are still to be identified.

Endocrine gland-derived VEGF (EG-VEGF) is an angiogenic factor secreted by the placenta during the first trimester of human pregnancy [6–8]. We have recently demonstrated that EG-VEGF

Padma Murthi and Cathy Vaillancourt (eds.), *Preeclampsia: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, vol. 1710, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7498-6_25, © Springer Science+Business Media LLC 2018

controls trophoblast invasion, is upregulated by hypoxia, and is abnormally elevated in pathological pregnancies complicated with PE and IUGR (intrauterine growth restriction) [6–10].

EG-VEGF circulating levels are around 50 pg/mL in the serum of nonpregnant women and increase fivefold during the first trimester of pregnancy (≈250 pg/mL) [7, 10]. In relation to pregnancy PE and IUGR, circulating EG-VEGF levels are significantly increased during the third trimester, suggesting that sustained EG-VEGF levels beyond the first trimester of pregnancy may contribute to the development of pregnancy pathologies including PIH and that elevated EG-VEGF levels might constitute a potential biomarker for PE development. To test this hypothesis, we developed an animal model by implanting subcutaneously osmotic pumps delivering EG-VEGF into gravid OF1 mice on 11.5 days post coitus (dpc), which is equivalent to the end of the first trimester of human pregnancy. Mice were sacrificed at 15.5 and 18.5 dpc to assess (1) litter size and placental and fetal weight, (2) placental histology and function, (3) maternal blood pressure, (4) renal histology and function, and (5) circulating sFlt1 and sEng. Another group of mice was treated at 7.5 dpc and sacrificed at 12.5 dpc to assess trophoblast invasion within the maternal decidua.

Increased EG-VEGF levels caused significant defects in placental organization and function since 12.5 dpc. Both increased hypoxia and decreased trophoblast invasion were observed. Treated mice had elevated circulating sFlt1 and sEng and developed gestational hypertension with dysregulated maternal kidney function. EG-VEGF effect on the kidney function was secondary to its effects on the placenta, as similarly treated male mice had normal kidney functions. Altogether, this model provides a strong evidence to confirm that sustained EG-VEGF beyond the first trimester of pregnancy contributes to the development of PIH.

PE is generally described as a disease of two stages. Stage 1 occurs during trophoblast invasion, and stage 2 consists of the clinical manifestations. The great majority of animal models aim to mimic the second stage. We believe that the developed model mimics more stage 1 than stage 2 of the disease. While the present model does not recapitulate full symptoms of a typical PE observed in women and to certain extent in strong models such as the RUPP, sFlt-1, and sEng animal models [4, 11, 12], it does bring strong information about the mechanism of stage 1 development of PIH.

2 Materials

2.1 Mice and Chemicals

1. Female mice nulliparous around 8–12 weeks of age.
2. Male mice (used as control).
3. Osmotic pumps: delivery 0.5 μL/h for 5–7 days.

4. Recombinant human EG-VEGF.
5. Vehicle: 0.9% NaCl solution.
6. Surgical kit (clamps, scissors, and surgical suture).
7. General anesthesia device based on isoflurane.
8. Chemical anesthesia: ketamine/xylazine mix (1 mL ketamine +0.5 mL xylazine +8.5 mL 0.9% NaCl).

2.2 Characterization of the PIH Model

1. Noninvasive computerized tail-off system: CODA8 system.
2. 25 G needle.
3. 1 mL syringes.
4. EDTA.
5. 1.5 mL blood collection tubes containing heparin.
6. Metabolic chambers that allow the separation of urine and feces.
7. Tissue fixation: 4% paraformaldehyde (PFA); free formalin fixative (FFF).
8. Human EG-VEGF ELISA assay kit.
9. Murine sFLT1 ELISA assay kit.
10. Murine sEndoglin ELISA assay kit.
11. Hematoxylin.
12. Eosin.
13. Antibodies used for placental characterization: CD31 (marker of trophoblast vascularization), carbonic anhydrase IX (CA9; marker of hypoxia), cytokeratin 7 (trophoblast marker), and PCNA (proliferating cell marker).
14. Image J software to measure placental zones.

3 Methods

3.1 Assessment of Stage 1 of PIH: Trophoblast Invasion

Group 1 of animals (n = 20) was used to assess the degree of trophoblast invasion and hence stage 1 of preeclampsia development. Group 1 was treated at 7.5 dpc after the observation of the plug at 0.5 dpc (*see* **Note 1**). During their gestation and before the delivery of the treatment, all mice were adapted to the blood pressure device (*see* **Notes 2** and **3**). These mice were randomly assigned to receive an osmotic pump delivering either recombinant human EG-VEGF (4 μg; 0.5 μL/h for 5 days) or saline (Fig. 1) (*see* **Notes 4** and **5**). During this procedure mice were under isoflurane anesthesia (*see* **Notes 6** and **7**).

At 12.5 dpc, control and treated mice were euthanized. Chemical anesthesia was induced by intraperitoneal injection of ketamine/xylazine mixture (100 μL per 10 g of weight). After anesthesia, blood was collected by intracardiac puncture performed

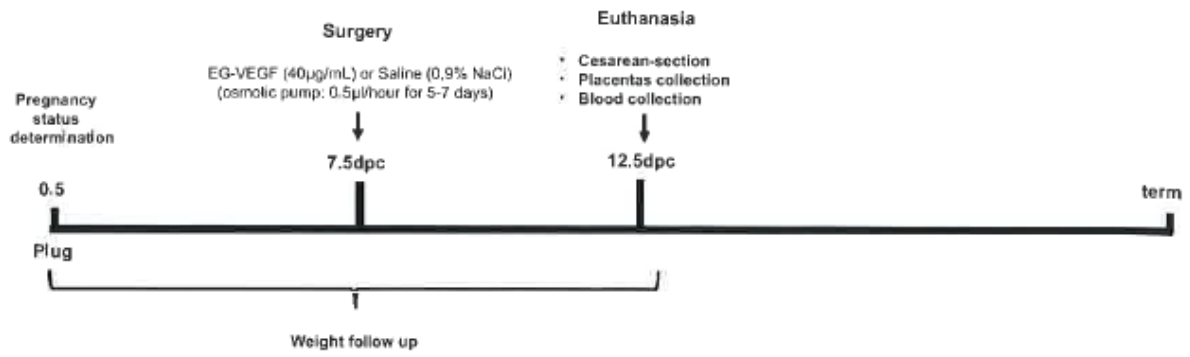


Fig. 1 Experimental procedures for group 1 of gravid mice. The flowchart shows the experimental procedures performed during the first study. The gravid mice were randomly assigned to receive at 7.5 either osmotic pump containing recombinant EG-VEGF or saline. Gravid mice were sacrificed at 12.5 dpc (n = 20 mice). At 12.5 dpc, placenta and maternal blood were collected

with 25 G needle mounted on 1 mL syringes damped with EDTA. After exsanguination, the heart was removed to ensure the death and cesarean section was performed.

Placentas and fetuses were collected and weighed. Placental tissues were fixed in 4% PFA and FFF for histological characterization or frozen at −80 °C for RNA or protein analysis.

Blood collection tubes were centrifuged at 1200 × g for 10 min; plasma was collected and stored at −20 °C.

3.2 Assessment of Stage 2 of PIH: Development of PIH Symptoms

Group 2 of animal (n = 41) was used to assess stage 2 of pre-eclampsia development and hence clinical manifestations of the disease. This group was treated at 11.5 dpc after the observation of the plug at 0.5 dpc. These mice were randomly assigned to receive an osmotic pump delivering either recombinant human EG-VEGF (4 µg, 0.5 µL/h for 5–7 days) or saline (Fig. 2). A subgroup of ten mice was sacrificed at 15.5 dpc, and the second subgroup of ten mice was sacrificed at 18.5 dpc.

3.2.1 From 0.5 to 7.5 dpc

OF1 mice were housed under controlled illumination (12:12, light: dark cycle) and feed ad libitum. Two- to three-month-old mice were mated and used to generate gravid mice. The date of the presence of the vaginal plug was taken at 0.5 dpc.

Plugged mice were weighed every day, and blood pressure was measured using noninvasive computerized tail-off system. It consists of 7-day adaptation in order to reduce the stress during the experimentation.

At 7.5 dpc, blood pressure was taken and mice were housed for 24 h in metabolic chambers in order to collect urine and feces separately. Urine was stored at −20 °C until the test.

3.2.2 From 8.5 to 12.5 dpc

Mice were weighed every 2 days (9.5 and 11.5 dpc) and mean arterial pressure was taken at 11.5 dpc just before the surgery. Mice were randomly assigned to receive an EG-VEGF (40 µg/mL)

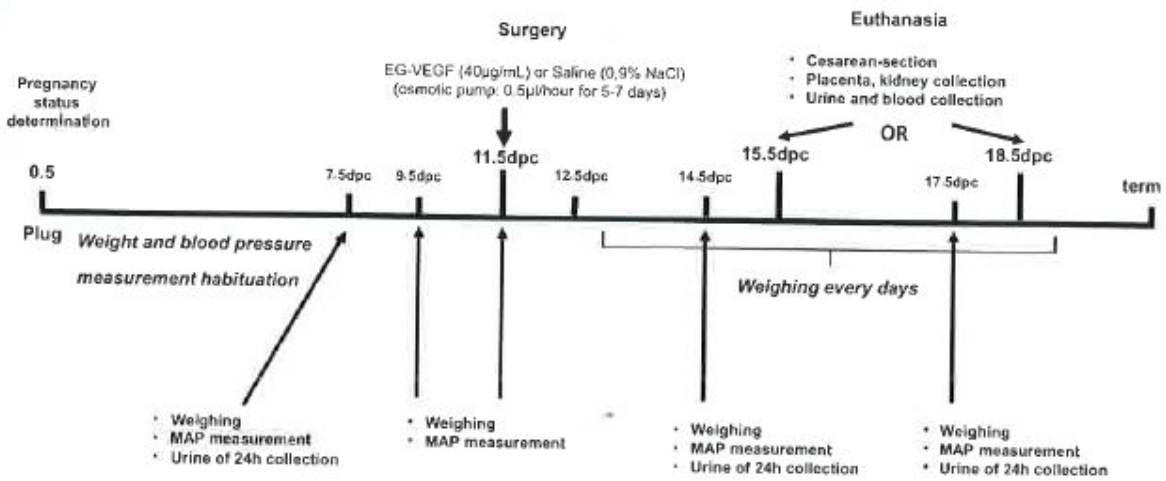


Fig. 2 Experimental procedures for group 2 of gravid mice. The flowchart shows the experimental procedures performed during the second study. The gravid mice were randomly assigned to receive at 11.5 dpc either osmotic pump containing recombinant EG-VEGF or saline. Gravid mice treated at 11.5 dpc were sacrificed at 15.5 dpc ($n = 21$ mice) or 18.5 dpc ($n = 20$ mice). At 15.5 dpc and 18.5 dpc placenta, maternal kidney, urine, and blood were also collected. Blood pressure was measured at 15.5 dpc and 18.5 dpc

osmotic pump ($n = 20$) or saline osmotic pump ($n = 20$). Anesthesia induction was performed by 4% isoflurane in the box. Then mice were placed on hot plate and anesthesia was maintained at 1.5% isoflurane in the mask.

At 11.5 dpc, mice skin was shaved at the abdomen level and opened of about 2 cm; the osmotic pump was loaded with 100 µL of EG-VEGF (4 µg) or saline and placed in the peritoneal cavity at the left flank.

Surgical incision was closed in two steps, peritoneum and muscles were sewn up with surgical wire and four to five staples were placed to reattach the skin. The closed wound was sanitized with betadine before mice replacement in the cage.

3.2.3 From 13.5 to 15.5 dpc

After surgery, mice were weighed every day. At 14.5 dpc, mean arterial pressure was measured and mice were placed in metabolic chambers for 24 h; collected urine was frozen at −20 °C. At 15.5 dpc, ten mice of EG-VEGF treated and of control group were randomly euthanized. Chemical anesthesia was induced by intraperitoneal injection of ketamine/xylazine mixture (100 µL/10 g of weight). After anesthesia, blood was collected by intracardiac puncture performed with 25 G needle mounted on 1 mL syringes soaked with EDTA. After exsanguination, the heart was removed to ensure the death.

Placentas and fetuses were weighed. Placental tissues, kidneys, and all other organs of interest were fixed in 4% PFA and FFF for histological characterization or frozen at −80 °C for RNA or protein analysis.

Blood collection tubes were centrifuged at 1200 × *g* for 10 min; plasmas were collected and stored at −20 °C.

3.2.4 From 16.5 to 18.5 dpc

At 17.5 dpc, the 20 mice remaining were weighed and mean arterial pressure measured. Then the mice were housed in metabolic chambers for 24 h; collected urines were frozen at −20 °C.

At 18.5 dpc, mice were euthanized and blood and tissues collected. Placentas and fetuses were weighed. Placental tissues, kidneys, and all other organs of interest were fixed in 4% PFA and FFF for histological characterization or frozen at −80 °C for RNA or protein analysis.

Blood collection tubes were centrifuged at 1200 × *g* for 10 min; plasmas were collected and stored at −20 °C.

3.2.5 Validation of the Pregnancy-Induced Hypertension Model

Gravid mice treatment with EG-VEGF caused a significant increase in the maternal circulating levels of EG-VEGF. These levels reached 2.5 times the normal levels (*see* **Note 8**).

At day 15.5 dpc, there was a significant increase in the maternal arterial pressure (20% increase).

Compared to saline mice, EG-VEGF-treated mice exhibited a significant increase in the anti-angiogenic factor, sFlt-1. An average of 20% increase was observed both at 12.5 and 15.5 dpc. One hundred microliter of plasma was used to assess sFlt-1 levels using the ELISA kit from Ray Biotech Company. Significant increase in sEndoglin circulating levels was also observed in EG-VEGF-treated mice at 15.5 and at18.5 dpc. One hundred microliter of plasma was used to assess sEndoglin in the ELISA kit from R&D System.

Deleterious effects were also observed in the maternal renal function of EG-VEGF-treated mice. There was a significant increase in the albumin to creatinine ratio. Renal histology showed an increase in the number of abnormal glomeruli compared to the kidneys of saline-treated mice. Abnormal glomeruli corresponded to renal glomerulosclerosis instead of endotheliosis, as observed in full PE models (Fig. 3).

4 Notes

The present protocol was set up to assess stage 1 and stage 2 of the development of preeclampsia in relation to a deregulation of a given factor, in our case EG-VEGF. This protocol could be applied to any study that aims at assessing the effect of a circulating factor on the development of preeclampsia at both stages of its development and manifestation. Nevertheless, this protocol was subjected to strict follow-ups that generated the following difficulties.

1. Plugs needed to be verified early in the morning, as total liquefaction occurs 12–14 h after coitus.

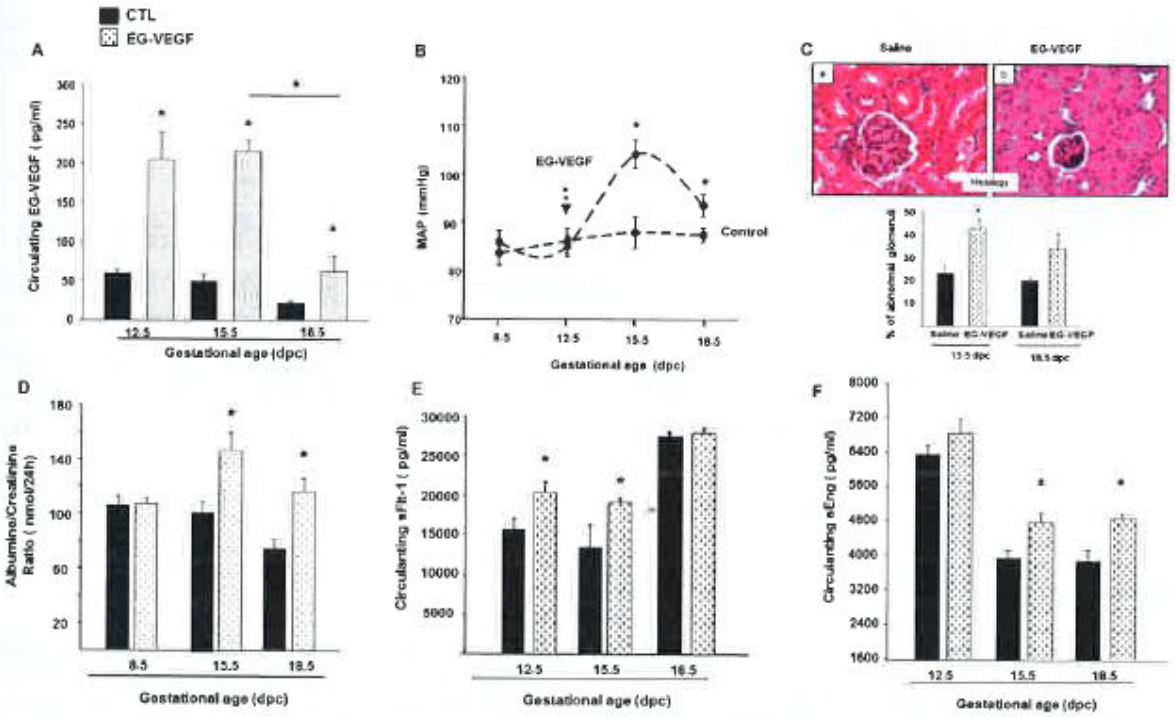


Fig. 3 (**a**) Reports EG-VEGF serum levels in gravid mice treated with EG-VEGF. A total of 65 serum samples were analyzed. Data are presented as bar graphs (* $P < 0.05$). (**b**) Reports summary of MAP recorded longitudinally before and during EG-VEGF treatment (arrow). Data are expressed as mean ± SEM (*$P < 0.05$). (**c**) Shows representative photomicrographs of hematoxylin-eosin-stained kidney sections from gravid saline and EG-VEGF-treated mice at 15.5 dpc of gestation. (**d**) Reports percentage of abnormal glomeruli in control and treated mice at 15.5 and 18.5 dpc. Data are expressed as mean ± SEM (* $P < 0.05$). (**e**) Reports summary of 24 h urinary albumin/creatinine ratio at days 8.5, 15.5, and 18.5 of gestation. Data are expressed as mean ± SEM (* $P < 0.05$). (**f**). EG-VEGF treatment increased circulating sFlt-1 (* $P < 0.05$). (**G**) EG-VEGF treatment increased circulating sEng. Data are expressed as mean ± SEM (* $P < 0.05$)

2. Adaptation of mice to the blood pressure device was crucial for the good practice of this assessment and to get reliable results.
3. Because of their gain of weight during gestation, blood pressure measurements had to be adapted by using larger tubes, such as those conceived to assess blood pressure in rats. This problem starts after 12.5 dpc of gestation.
4. In the absence of ultrasound analysis, mice gestation should be verified before inserting the osmotic pump. This should be performed with delicacy in order to not disrupt the progress of gestation.
5. Pump should be introduced gently with the drain device down.
6. Animals should not suffer during experimentation. During surgery, isoflurane anesthesia should be controlled until the end.
7. If animals show any pain signs (e.g., loss of 10% of weight, prostration, facial mimics, spiky hairs), they must be excluded of the experiment and euthanized.

8. The 2.5 fold eleveted concentration was chosen because we previousely demonstrated that EG-VEGF levels were 2.5 higher in PE women compared to age-matched control women.

Acknowledgments

We thank Dr. J. Boutonnat and Dr. A. Florin for their help for the histological assessment of kidney sections. We acknowledge the following sources of funding: *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale* (U1036), the University Grenoble-Alpes, *Commissariat à l'Energie Atomique* (DSV/iRTSV/BCI), the *Région Rhône-Alpes*, the *Ligue Nationale contre le Cancer*, and the *Ligue Départementale (Isère) contre le Cancer*.

References

1. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M (2005) Preeclampsia. Lancet 365(9461):785–799
2. Backes CH et al (2011) Maternal preeclampsia and neonatal outcomes. J Pregnancy 2011: 214365
3. Carty DM, Delles C, Dominiczak AF (2010) Preeclampsia and future maternal health. J Hypertens 28(7):1349–1355
4. Maynard SE, Karumanchi SA (2011) Angiogenic factors and preeclampsia. Semin Nephrol 31(1):33–46
5. Zeisler H et al (2016) Predictive Value of the sFlt-1:PlGF Ratio in Women with Suspected Preeclampsia. N Engl J Med 374(1):13–22
6. Brouillet S et al (2012) EG-VEGF: a key endocrine factor in placental development. Trends Endocrinol Metab 23(10):501–508
7. Hoffmann P, Feige JJ, Alfaidy N (2006) Expression and oxygen regulation of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 and its receptors in human placenta during early pregnancy. Endocrinology 147(4):1675–1684
8. Hoffmann P, Feige JJ, Alfaidy N (2007) Placental expression of EG-VEGF and its receptors PKR1 (prokineticin receptor-1) and PKR2 throughout mouse gestation. Placenta 28(10):1049–1058
9. Brouillet S et al (2010) Molecular characterization of EG-VEGF-mediated angiogenesis: differential effects on microvascular and macrovascular endothelial cells. Mol Biol Cell 21(16):2832–2843
10. Hoffmann P et al (2009) Role of EG-VEGF in human placentation: Physiological and pathological implications. J Cell Mol Med 13(8B): 2224–2235
11. Gilbert JS, Babcock SA, Granger JP (2007) Hypertension produced by reduced uterine perfusion in pregnant rats is associated with increased soluble fms-like tyrosine kinase-1 expression. Hypertension 50(6):1142–1147
12. Granger JP et al (2006) Reduced uterine perfusion pressure (RUPP) model for studying cardiovascular-renal dysfunction in response to placental ischemia. Methods Mol Med 122: 383–392

Annexe 3 : Article 4

PROK1 is a new actor in oocyte competence: expression and hormonal regulation throughout late folliculogenesis.

Je suis co-auteur de cet article, actuellement soumis dans le journal « Sterility and Fertility », pour ma participation à ce projet. Ce travail rapporte une partie des résultats obtenus lors de mon stage facultatif durant mon Master 2.

Title: PROK1 is a new actor in oocyte competence: expression and hormonal regulation throughout late folliculogenesis.

Running title: PROK1 is a new actor in oocyte competence.

Authors: Baron C[1,2,*], Alfaidy N[1,*], Reynaud D[1], Traboulsi W[1], Gueniffey A[2], Lamotte A[2], Melloul E[2], Dunand-Faure C[2], Villaret L[2], Bessonnat J[2], Mauroy C[2], Coutton C[3,4], Martinez G[4], Feige J-J[1], Hoffmann P[1,2], Hennebicq S[2,3] and Brouillet S[1,2,#].

Author affiliations and addresses:

[1] Université Grenoble-Alpes, Inserm, CEA, BIG-BCI, 38000, Grenoble, France. [2] Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, Hôpital Couple-Enfant, Centre Clinique et Biologique d'Assistance Médicale à la Procréation-CECOS, 38700, La Tronche, France. [3] Université Grenoble-Alpes, Inserm, IAB, GETI, 38000, Grenoble, France. [4] Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, Hôpital Couple Enfant, Département de Génétique et Procréation, Laboratoire de Génétique Chromosomique, 38700, La Tronche, France.

* B.C. and N.A. contributed equally to the study.

[#] *Corresponding author and person to whom reprint requests should be addressed:* Sophie Brouillet, PharmD, PhD. Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, Hôpital Couple-Enfant, Centre Clinique et Biologique d'Assistance Médicale à la Procréation-CECOS, 38700, La Tronche, France. Phone: +33476760071. Fax: +33476768950. e-mail: sophie_brouillet@yahoo.fr

Abstract:

Study question: Does Prokineticin 1 (PROK1) concentration in follicular fluid (FF) differ between mature and immature ovarian follicles?

Summary answer: FF PROK1 concentration is significantly increased in mature follicles.

What is known already? Follicular fluid (FF) is an important microenvironment controlling follicular growth, oocyte competence and subsequent embryo implantation ability. Recently, quantification of PROK1 in FF has been reported as a new predictive biomarker of *in vitro* fertilization (IVF) success. However, no study has characterized the regulation of PROK1 secretion in FF.

Study design, size, duration: A prospective study was conducted in 38 infertile women from May 2015 to May 2017 at the University Hospital of Grenoble. A total of 298 FF from 23 infertile couples undergoing IVF and 15 cumulus cell (CC) primary cultures from 15 infertile couples undergoing IVF-ICSI were collected. FF PROK1 concentrations were analyzed according to follicular size, follicular content, and oocyte competence (*in vivo* study). Regulation of PROK1 secretion by FSH, hCG and FSK was also investigated in primary follicular cells cultures (*in vitro* study).

Participants/materials, setting, methods: Samples were collected in the Germetheque Biobank. Signed informed consent was obtained from all patients who participated in the study. Follicular size (length and width) was measured by 2D-sonography during follicular growth monitoring and individual follicular puncture. Regulation of PROK1 secretion by gonadotropins was characterized in cumulus cell (CC) primary cultures. PROK1 concentration was quantified by ELISA assay.

Main results and the role of chance: PROK1 concentration is significantly increased in individual FF according to follicular size (n=298, ANOVA, $p<0.001$) and oocyte competence to achieve early embryo development (n=138, Mann-Whitney, $p<0.05$). FSH and hCG significantly up-regulated PROK1 secretion in CC cultures (n=5 and n=5, Mann-Whitney, $p<0.01$), probably *via* the cAMP pathway (n=5, Mann-Whitney, $p<0.05$).

Limitations, reasons for caution: Extensive bleeding or concomitant aspiration of follicles could distort individual FF PROK1 concentrations. In this study, bloodstained FF and FF with unexpected volumes according to their size were discarded.

Wider implications of the findings: PROK1 quantification in individual FF by ELISA is a quick and non-expensive test, which displays an appropriate sensitivity/specificity for clinical application. Further explorations are warranted to determine whether high PROK1 concentration in FF is a consequence or a cause of follicular maturity. In future, PROK1 treatment could be proposed as a new therapeutic approach to improve oocyte competence and IVF outcome.

Study funding/competing interest(s): INSERM (Unité 1036), Université Grenoble-Alpes,

Commissariat à l'Energie Atomique (DRF/BIG/BCI), Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble (CHUG), Agence de la Biomédecine (ABM), Groupe Pasteur Mutualité (GPM). Pr. PH, Drs AG and LV are clinically involved in follicular stimulation and IVF therapies, using gonadotrophins from all gonadotrophin distributors on the French market. Otherwise, the authors have no conflicts of interest in publishing this manuscript.

Trial registration number: none.

Key words: PROK1, EG-VEGF, follicular fluid, gonadotropin, IVF

.

Introduction

Follicular fluid (FF) is an important microenvironment influencing follicular growth and oocyte developmental competence to achieve embryo implantation {Dumesic, 2015 #674}. Recently, new predictive biomarkers of *in vitro* fertilization (IVF) pregnancy rates have been reported in FF {Bracewell-Milnes, 2017 #675}. However, their clinical validation is mandatory to significantly improve the identification of embryos with high implantation potential to increase the occurrence of singleton pregnancy and the decrease of medical complications and economic burden of multiple gestations. Among these new biomarkers of IVF success, Prokineticin 1 (PROK1, also named EG-VEGF for Endocrine Gland-derived Vascular Endothelial Growth Factor) seems to be a promising candidate {Gao, 2012 #384;Brouillet, 2013 #497;Alfaidy, 2016 #676} It is highly expressed in endocrine tissues, including the testis, the adrenal gland, the ovary, and the placenta {LeCouter, 2001 #11}. It mediates its biological activities *via* two G protein-coupled receptors named prokineticin receptor-1 (PROKR1) and -2 (PROKR2) {Lin, 2002 #10}. PROK1 has been described as a new actor in human fertility, with major roles in placental development, ovarian disorders and endometrial receptivity {Maldonado-Perez, 2007 #30;Brouillet, 2014 #618}. In the human ovary, PROK1 is highly expressed in FF, oocyte and follicular cells from primordial to preovulatory follicles {Ferrara, 2003 #271;Alfaidy, 2016 #676}. PROK1 is both highly secreted by granulosa (GC) and cumulus (CC) cells, suggesting that its FF concentration mainly results from a local secretion from follicular cells {Alfaidy, 2016 #676}. Recently, FF PROK1 quantification has been reported as a new non-invasive biomarker of IVF outcome, suggesting its role in oocyte competence {Alfaidy, 2016 #676}. However, little is known regarding its local regulation and secretion within ovarian follicles. The up-regulation of PROK1 secretion by gonadotropins has been already described in human placental trophoblastic cells {Brouillet, 2012 #387}, in endometrial epithelial cells {Evans, 2009 #256} and in luteinized granulosa cells {Fraser, 2005 #270}. These data suggest that FF PROK1 content could be modulated in response to FSH/hCG stimulation treatment in IVF and therefore play a role in oocyte maturity. Hence, the main objective of this study was to characterize individual FF PROK1 secretion in pre-ovulatory follicles in IVF patients. The secondary objectives were to investigate the regulation of PROK1 secretion by gonadotropins and to determine the relationship between individual FF PROK1 concentration and oocyte maturity.

Materials and methods

Population

We recruited 38 infertile women from November 2014 to May 2018 in the assisted reproductive technics (ART) laboratory at the University Hospital of Grenoble, France. Figure 1 illustrates the flow chart of the study group. All women met the following inclusion criteria: (1) both ovaries were present and exempt of morphological abnormalities or surgical history; (2) basal FSH circulating level of <10 IU/L on the third day of the unstimulated cycles; (3) no current or past disease affecting the ovaries. Women with tobacco use, polycystic ovary syndrome (PCOS), recurrent pregnancy loss, or ectopic pregnancy were not enrolled as deregulation of the PROK1/PROKR system has been reported under these conditions {Gao, 2011 #492;Su, 2010 #389;Ferrara, 2003 #271;Shaw, 2010 #498;Shaw, 2010 #499;Holloway, 2013 #575;Salker, 2010 #501}. Samples were included in the GERMETHEQUE Biobank after signed informed consent from the patients (the procedure was approved by the institutional ethics review board, CPP Sud-Ouest). Women with ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) were excluded (n=2) as deregulation of PROK1 has been reported under this condition {Gao, 2011 #492}, as well as women with empty follicle syndrome to exclude pathological folliculogenesis (n=1).

IVF stimulation

All women were superovulated by treatment with FSH or human menopausal gonadotropin (hMG) (GONALF®, PUREGON®, FOSTIMON®, MENOPUR®) following down-regulation with GnRH agonists (SYNAREL®, DECAPEPTYL®) or antagonists (ORGALUTRAN®, CETROTIDE®). The follicular development was monitored by 2D transvaginal sonography and serum estradiol (E2) measurements from the 6th day of stimulation to the day of ovulation induction. When at least three follicles had reached a diameter of 16 mm or more, ovulation was triggered with a single injection of 5,000 IU of human chorionic gonadotropin hormone (hCG) administered subcutaneously (5000 UI, OVITRELLE®).

Oocyte retrieval

Transvaginal ultrasound-guided follicle retrieval was conducted 35h after hCG administration. Only follicles over 10 mm were aspirated using a single lumen 17 G needle connected with vaccum aspiration system. Individual follicular aspiration was performed with 1 ml of Flushing Medium® (Origio®). Each FF was maintained at 37 °C until cumulus-oocyte complexes (COCs) collection in the ART laboratory. COCs were isolated for conventional IVF or ICSI procedures. Before microinjection for ICSI, oocyte maturity was assessed after denudation.

Individual follicular fluids (FFs) collection

A total of 298 FF from 23 couples undergoing IVF treatment was collected and analyzed for follicular size, oocyte recovery and PROK1 content. The length and the width of each follicle were measured before aspiration by 2D-sonography, allowing the estimation of the follicular size. The same operator performed all measurements and aspirations. Immediately after COCs collection, individual FF samples were centrifuged individually at 1,000 rpm for 10 min at room temperature to isolate the FF from luteinized granulosa cells and erythrocytes, and supernatants were immediately stored in several aliquots at -20°C. To avoid any blood contamination, only clear follicular fluid samples were included, whereas bloodstained FF samples were discarded. FF with unexpected volumes according to the size of the corresponding follicle were discarded to limit the impact of concomitant aspiration of follicles. FF volume ranged from 0.5 to 9.7 ml. The mean volume of FF was 2.90 ml ± 0.1 ml. Follicular size ranged from 10 to 28 mm. The mean size of follicles at the time of aspiration was 17.65 mm ± 0.25 mm. The results are in concordance with literature {Thuesen, 2014 #677;Nishigaki, 2011 #678;Wirleitner, 2018 #679}. Follicles were divided into five groups according to their size: from 10 to 13 mm, n = 51; from 14 to 16 mm, n = 71; from 17 to 19 mm, n = 75; from 20 to 22 mm, n = 63; from 23 to 28 mm, n = 38. The relationship between FF volume and the corresponding follicular diameter is shown in Supplementary Figure 1.

Cumulus cells (CCs) collection and culture

As CCs primary cultures are the best cellular model to investigate pre-ovulatory follicular physiology {Chian, 1999 #680}, we used this model to investigate the impact of gonadotropin treatment. CC were isolated from 15 women undergoing IVF with intracytoplasmic sperm injection (ICSI). COCs were denuded of their surrounding CCs both enzymatically and mechanically using 80 IU/ml of hyaluronidase (JCD®) and Stripper tips (Origio®). CC were collected and centrifuged at 350g for 5 min at room temperature. The harvested cells were suspended in DMEM-F12 medium (Gibco®) supplemented with 1UI/mL penicillin/streptomycin (PAA®) and seeded into plastic culture dishes (1×10^4 viable cells per well). CCs viability was assessed by 1% (wt/vol) trypan blue dye exclusion. One day later, the cells were rinsed three times and incubated in 500µl of fresh culture medium ± FSH 5 U.I./L (Puregon®, NV Organon) {von Wolff, 2014 #681;Rosen, 2009 #682;Thuesen, 2014 #677;Wirleitner, 2018 #679}, hCG 1 U.I./L (Ovitrelle®, Merck Serono) {Rosen, 2009 #682;Thuesen, 2014 #677} or FSK 10µM (Forskoline, Sigma-Aldrich, REFF6886). The cells were then incubated at 37°C in a humidified tissue culture incubator with 95% air and 5% CO2. The supernatants were collected after 24h of culture.

PROK1 quantification by ELISA Assay

PROK1 was measured in each individual FF using a commercial ELISA test (human EG-VEGF/PROK1 ELISA development kit, Peprotech®) according to the manufacturer's recommendations. All samples were in the linear range of the standard curves when using a five-fold dilution of FF. Each sample was run in duplicate with <10% intra-assay coefficient of variation. The detection limit of the assay was 16 pg/ml.

Statistical analysis

Statistical significance was defined as $p < 0.05$. The data were summarized as mean ± standard error of the mean (SEM). Normality of data was assessed firstly by histogram in addition to the formal tests used for normality as Shapiro test. Mann Whitney was used for experiments with two groups whereas the ANOVA followed by Dunn's method was used for experiments with more than two groups, as non- parametric methods

.

Results

Experimental Design and Patient Clinical Characteristics

Patient characteristics are detailed in Table 1. For FF samples, the women's age ranged from 25.04 to 36.97 years (mean ± SEM: 32.70 ± 0.87 years) with a body mass index (BMI) from 18.65 to 33.22 kg/m^2 (mean ± SEM: 22.97 ± 1.01 kg/m^2). AMH concentration of women at day-3 was 3.48 ± 0.45 ng/ml. Infertility duration was 4.44 ± 0.46 years. FSH starting dose was 179.72 ± 12.04 I.U./day during 9.86 ± 0.26 days. The average number of 12.86 ± 0.89 retrieved follicles and 7.63 ± 0.82 COCs per ovarian puncture was obtained. For CC samples, the women's age ranged from 25.38 to 36.29 years (mean ± SEM: 31.88 ± 0.89 years) with a body mass index (BMI) from 18.99 to 32.82 kg/m^2 (mean ± SEM: 22.01 ± 0.93 kg/m^2). AMH concentration of women at day-3 was 3.33 ± 0.35 ng/ml. Infertility duration was 3.79 ± 0.29 years. FSH starting dose was 180.06 ± 11.69 I.U./day during 10.00 ± 0.30 days. The average number of 12.66 ± 1.02 retrieved follicles and 7.47 ± 0.86 COCs per ovarian puncture was obtained.

PROK1 concentration in individual FF according to follicular size

Follicles were divided into three groups according to their size: small (10-14 mm; n = 75), intermediate (15–19 mm; n = 104) and large (≥20 mm; n = 119). The concentration of PROK1 ranged from 0.23 to 5.21 ng/ml with high intra-individual and inter-individual variabilities (Figure 2). The mean concentration was 2.06 ± 0.07 ng/ml. The relationship between FF concentration of PROK1 and follicular diameter is shown in Figure 3. We observed a significant increase in PROK1 concentration with follicular growth (n=298, ANOVA, $p< 0.001$).

PROK1 concentration in individual FF according to follicular content

Of the 298 retrieved follicles, 171 COCs were isolated during oocyte recovery including 6 atretic COCs. PROK1 concentration was 2.1 ± 0.09 ng/ml in FF containing COCs compared to 2.0 ± 0.09 ng/ml in empty or atretic follicles, respectively (figure 4, Mann-Whitney, p=0.15). The mean size of follicles was comparable in both groups (18.1 mm versus 18.0 mm, p=0.91).

PROK1 concentration in individual FF according to oocyte competence

We characterized PROK1 concentration in FF according to oocyte competence to achieve fertilization (Figure 5A) and early embryo development (Figure 5B). PROK1 concentration in FF containing two pronuclei zygotes was 2.1 ± 0.11 ng/ml compared to 2.0 ± 0.14 ng/ml in FF associated with unfertilized, one pronucleus or ≥ three pronuclei oocytes, respectively (Figure 5A, n=165, Mann-Whitney, p=0.3). The mean size of follicles was comparable in both groups (18.5 mm versus 17.8 mm, p=0.45). PROK1 concentration was 2.4 ± 0.15 ng/ml in FF associated to competent oocytes that achieved early embryo cleavage compared to 1.9 ± 0.12 ng/ml in FF associated to oocytes with poor developmental potential (Figure 5B, n=138, Mann-Whitney, p=0.016). The mean size of follicles was comparable in both groups (18.2 mm versus 18.1 mm, p=0.73).

PROK1 regulation by gonadotropins

To characterize gonadotropin regulation of PROK1 secretion into FF, we determined PROK1 secretion in CCs primary cultures obtained from 15 patients undergoing an IVF-ICSI. As shown in Figures 6A and 6B, FSH and hCG significantly increase PROK1 secretion (n=5, Mann-Whitney, FSH and hCG, 24h of treatment, p<0.01). In Figure 6C, we observe a significant increase of PROK1 secretion in response to forskolin (FSK), an activator of protein kinase A (PKA) that stimulate the cAMP pathway (n=5, Mann- Whitney, FSK 24h, p<0.05)

.

Discussion

Follicular size is the current surrogate marker of follicular maturation in IVF. Several authors reported an increase of metaphase II oocyte recovery, fertilization or/and developmental competence of the subsequent embryo in large follicles {Rosen, 2008 #684;Revelli, 2014 #685}. However, the predictive value of follicular size in IVF outcome remains debated. Indeed, follicular size has been reported to be of limited usefulness in predicting oocyte competence and embryo implantation potential {Revelli, 2014 #685}. Hence, validation of new reliable biomarkers of oocyte competence is mandatory to improve IVF pregnancy rates. Recently, FF PROK1 quantification has been reported as a promising candidate to predict subsequent embryo implantation in IVF {Alfaidy, 2016 #676}. However, the factors that influence PROK1 secretion into FF were still unknown. In this study, we characterize for the first time the significant increase in PROK1 concentration with follicular size. We also observe an important intra-individual variation of FF PROK1 within follicular cohorts and a higher concentration of PROK1 in FF associated to competent oocytes that achieve early embryo development. Altogether, this study provides new evidence for PROK1 contribution to human follicular development. Previous studies reported PROK1 expression from primordial to pre-ovulatory follicles in humans {Ferrara, 2003 #271;Zhang, 2003 #491;Alfaidy, 2016 #676}, as well as in the corpus luteum {Fraser, 2005 #270}. In human placenta, PROK1 has been reported to promote cell proliferation and survival {Brouillet, 2013 #385;Hoffmann, 2009 #77}, and to increase angiogenesis and endothelial cell permeability {Brouillet, 2010 #388}. In the ovary, PROK1 has been associated with many conditions including PCOS, OHSS, and ovarian cancer {Gao, 2011 #492;Ferrara, 2003 #271;Zhang, 2003 #491;Balu, 2012 #489}. Altogether, these data suggest that PROK1 may stimulate follicular cell proliferation and permeability that occur through proper development of antral follicles. This hypothesis advocates that high PROK1 concentration may reflect the ability of the follicle to create a suitable cellular network that guarantees a better follicular microenvironment for the developing oocyte.

As gonadotropins are key regulators of follicular growth and oocyte competence {Oktem, 2010 #686;Zhang, 2009 #687}, we also investigated FSH and hCG regulation of PROK1 secretion in CC primary cultures and demonstrated that PROK1 secretion is significantly increased by both gonadotropins, probably *via* the cAMP pathway. Our data are in line with hCG up-regulation of PROK1 secretion previously reported in human trophoblast {Brouillet, 2012 #387}, in human first trimester decidua {Evans, 2009 #256}, and in human luteinized granulosa cells {Fraser, 2005 #270}. The promoter of PROK1 gene contains two canonical cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) response elements: CRE1 (cyclic AMP responsive element 1), located at -1,728 bp, and CRE2 (cyclic AMP responsive element-like 2), located at -383 bp. As gonadotropins actions are known to be largely mediated through increasing cAMP {Lindner, 1974 #688;Landomiel, 2014 #689;Ryu, 1996 #690}, one could speculate that LH might also act on PROK1 secretion in human ovarian follicles. Further studies are needed to decipher the exact role of PROK1 in follicular maturation and ovulation induction.

Altogether, our data highlight the potential use of FF PROK1 quantification as a biomarker of follicular maturity. Indeed, FF is the by-product of oocyte aspiration from ovarian follicles; its collection is non-invasive and easy during oocyte pick-up, representing an optimal source of non-invasive biochemical predictors of oocyte quality. Currently, selection of COCs or oocyte for fertilization during IVF procedures only relies on the evaluation of oocyte nuclear competence that is based on morphological criteria (presence or absence of one polar body within the perivitelline space). Hence, reliable biomarkers of oocyte cytoplasmic maturation could significantly improve IVF outcome {Watson, 2007 #691}. To date, several FF factors have already been reported as promising predictive candidates for oocyte competence in IVF routine, such as IGFs and Apolipoprotein B {Sjoblom, 1999 #692;Ziebe, 2013 #693;Kawano, 1997 #694}. Changes in FF composition according to the follicle size or follicle maturity have already been reported {Wen, 2006 #695;Malizia, 2010 #696;Nishigaki, 2011 #678}. Here, our results support the relevance of FF PROK1 quantification as a predictive biomarker of follicular growth and oocyte competence. If so, PROK1 could represent a supplemental non-invasive prognostic/diagnostic tests for IVF. Indeed, PROK1 quantification is easy to perform, it could be obtained within the five hours following sample collection, and cost less than one euro per IVF attempt. Further studies are required to evaluate the predictive value of individual FF PROK1 quantification in the evaluation of fertilization and developmental competence of the oocyte.

Conclusion

In conclusion, we report for the first time a follicular size-dependent concentration of PROK1 within human ovarian FF, the regulation of its secretion by gonadotropins and its association with oocyte competence. Further explorations are warranted to delineate the actions of PROK1 within the human ovary and to determine whether high PROK1 concentration in FF is only a consequence or a cause of follicular maturity. In future, PROK1 treatment could represent a new therapeutic approach to improve oocyte competence and IVF outcome.

Author's roles

Patient selection and care: G.A., M.E., D-F.C., V.L., B.J., C.C., H.P, H.S, B.S.; sample collection and processing: B.C., A.N., R.D., T.W., M.G, B.S.; PROK1 measurements: B.C., A.N., R.D., T.W., G.A., M.E., B.S.; data analysis and interpretation: B.C., A.N., F. J-J., H.P., H.S., B.S.; study design: A.N., H.P., H.S., B.S.; manuscript drafting: A.N., F. J-J, B.S. All authors read, critically revised and approved the final manuscript.

Acknowledgments

We acknowledge Dr. Pierre Truong and Dr. Laure Descombe of the department of Gynecology and Obstetrics at the Chambéry Hospital for their contribution.

Funding

INSERM (Unité 1036), Université Grenoble-Alpes, Commissariat à l'Energie Atomique (DRF/BIG/BCI), Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble (CHUG), Agence de la Biomédecine (ABM), Groupe Pasteur Mutualité (GPM).

Conflict of interest

Pr. PH, Drs AG and LV are clinically involved in follicular stimulation and IVF therapies, using gonadotrophins from all gonadotrophin distributors on the French market. Otherwise, the authors have no conflicts of interest in publishing this manuscript.

Reference list

Alfaidy, N., P. Hoffmann, P. Gillois, A. Gueniffey, C. Lebayle, H. Garcin, C. Thomas-Cadi, J. Bessonnat, C. Coutton, L. Villaret, N. Quenard, U. Bergues, J.J. Feige, S. Hennebicq, and S. Brouillet. 2016. PROK1 Level in the Follicular Microenvironment: A New Noninvasive Predictive Biomarker of Embryo Implantation. *J Clin Endocrinol Metab*. 101:435-444.

Balu, S., L. Pirtea, P. Gaje, A.M. Cimpean, and M. Raica. 2012. The immunohistochemical expression of endocrine gland-derived-VEGF (EG-VEGF) as a prognostic marker in ovarian cancer. *Rom J Morphol Embryo*. 53:479-483.

Bracewell-Milnes, T., S. Saso, H. Abdalla, D. Nikolau, J. Norman-Taylor, M. Johnson, E. Holmes, and M.Y. Thum. 2017. Metabolomics as a tool to identify biomarkers to predict and improve outcomes in reproductive medicine: a systematic review. *Hum Reprod Update*. 23:723-736.

Brouillet, S., P. Hoffmann, N. Alfaidy, and J.J. Feige. 2014. [Prokineticins: new regulatory peptides in human reproduction]. *Med Sci (Paris)*. 30:274-279.

Brouillet, S., P. Hoffmann, M. Benharouga, A. Salomon, J.P. Schaal, J.J. Feige, and N. Alfaidy. 2010. Molecular characterization of EG-VEGF-mediated angiogenesis: differential effects on microvascular and macrovascular endothelial cells. *Mol Biol Cell*. 21:2832-2843.

Brouillet, S., P. Hoffmann, S. Chauvet, A. Salomon, S. Chamboredon, F. Sergent, M. Benharouga, J.J. Feige, and N. Alfaidy. 2012. Revisiting the role of hCG: new regulation of the angiogenic factor EG-VEGF and its receptors. *Cell Mol Life Sci*. 69:1537-1550.

Brouillet, S., P. Hoffmann, C. Thomas-Cadi, U. Bergues, J.J. Feige, N. Alfaidy, and S. Hennebicq. 2013a. PROK1, prognostic marker of embryo implantation? *Gynecol Obstet Fertil*. 41:562-565.

Brouillet, S., P. Murthi, P. Hoffmann, A. Salomon, F. Sergent, P. De Mazancourt, M. Dakouane-Giudicelli, M.N. Dieudonne, P. Rozenberg, D. Vaiman, S. Barbaux, M. Benharouga, J.J. Feige, and N. Alfaidy. 2013b. EG-VEGF controls placental growth and survival in normal and pathological pregnancies: case of fetal growth restriction (FGR). *Cell Mol Life Sci*. 70:511-525.

Chian, R.C., A. Ao, H.J. Clarke, T. Tulandi, and S.L. Tan. 1999. Production of steroids from human cumulus cells treated with different concentrations of gonadotropins during culture in vitro. *Fertil Steril*. 71:61-66.

Dumesic, D.A., D.R. Meldrum, M.G. Katz-Jaffe, R.L. Krisher, and W.B. Schoolcraft. 2015. Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertil Steril*. 103:303-316.

Evans, J., R.D. Catalano, P. Brown, R. Sherwin, H.O. Critchley, A.T. Fazleabas, and H.N. Jabbour. 2009. Prokineticin 1 mediates fetal-maternal dialogue regulating endometrial leukemia inhibitory factor. *FASEB J*. 23:2165-2175.

Ferrara, N., G. Frantz, J. LeCouter, L. Dillard-Telm, T. Pham, A. Draksharapu, T. Giordano, and F. Peale. 2003. Differential expression of the angiogenic factor genes vascular endothelial growth factor (VEGF) and endocrine gland-derived VEGF in normal and polycystic human ovaries. *Am J Pathol*. 162:1881-1893.

Fraser, H.M., J. Bell, H. Wilson, P.D. Taylor, K. Morgan, R.A. Anderson, and W.C. Duncan. 2005. Localization and quantification of cyclic changes in the expression of endocrine gland vascular endothelial growth factor in the human corpus luteum. *J Clin Endocrinol Metab*. 90:427-434.

Gao, M.Z., X.M. Zhao, Y. Lin, Z.G. Sun, and H.Q. Zhang. 2012. Effects of EG-VEGF, VEGF and TGF-beta1 on pregnancy outcome in patients undergoing IVF-ET treatment. *J Assist Reprod Genet*. 29:1091-1096.

Gao, M.Z., X.M. Zhao, Z.G. Sun, Y. Hong, L.W. Zhao, and H.Q. Zhang. 2011. Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor concentrations in follicular fluid and serum may predict ovarian hyperstimulation syndrome in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril*. 95:673-678.

Hoffmann, P., Y. Saoudi, M. Benharouga, C.H. Graham, J.P. Schaal, C. Mazouni, J.J. Feige, and N. Alfaidy. 2009. Role of EG-VEGF in human placentation: Physiological and pathological implications. *J Cell Mol Med*. 13:2224-2235.

Holloway, A.C., A. Salomon, M.J. Soares, V. Garnier, S. Raha, F. Sergent, C.J. Nicholson, J.J. Feige, M. Benharouga, and N. Alfaidy. 2013. Characterization of the adverse effects of nicotine on placental development: In vivo and in vitro studies. *American journal of physiology*.

Kawano, Y., H. Narahara, N. Matsui, K. Nasu, K. Miyamura, and I. Miyakawa. 1997. Insulin-like growth factor-binding protein-1 in human follicular fluid: a marker for oocyte maturation. *Gynecologic and obstetric investigation*. 44:145-148.

Landomiel, F., N. Gallay, G. Jegot, T. Tranchant, G. Durand, T. Bourquard, P. Crepieux, A. Poupon, and E. Reiter. 2014. Biased signalling in follicle stimulating hormone action. *Mol Cell Endocrinol*. 382:452-459.

LeCouter, J., J. Kowalski, J. Foster, P. Hass, Z. Zhang, L. Dillard-Telm, G. Frantz, L. Rangell, L. DeGuzman, G.A. Keller, F. Peale, A. Gurney, K.J. Hillan, and N. Ferrara. 2001. Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature*. 412:877-884.

Lin, D.C., C.M. Bullock, F.J. Ehlert, J.L. Chen, H. Tian, and Q.Y. Zhou. 2002. Identification and molecular characterization of two closely related G protein-coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*. 277:19276-19280.

Lindner, H.R., A. Tsafriri, M.E. Lieberman, U. Zor, Y. Koch, S. Bauminger, and A. Barnea. 1974. Gonadotropin action on cultured Graafian follicles: induction of maturation division of the mammalian oocyte and differentiation of the luteal cell. *Recent progress in hormone research*. 30:79-138.

Maldonado-Perez, D., J. Evans, F. Denison, R.P. Millar, and H.N. Jabbour. 2007. Potential roles of the prokineticins in reproduction. *Trends Endocrinol Metab*. 18:66-72.

Malizia, B.A., Y.S. Wook, A.S. Penzias, and A. Usheva. 2010. The human ovarian follicular fluid level of interleukin-8 is associated with follicular size and patient age. *Fertil Steril*. 93:537-543.

Nishigaki, A., H. Okada, R. Okamoto, S. Sugiyama, K. Miyazaki, K. Yasuda, and H. Kanzaki. 2011. Concentrations of stromal cell-derived factor-1 and vascular endothelial growth factor in relation to the diameter of human follicles. *Fertil Steril*. 95:742-746.

Oktem, O., and B. Urman. 2010. Understanding follicle growth in vivo. *Hum Reprod*. 25:2944-2954.

Revelli, A., G. Martiny, L. Delle Piane, C. Benedetto, P. Rinaudo, and I. Tur-Kaspa. 2014. A critical review of bi-dimensional and three-dimensional ultrasound techniques to monitor follicle growth: do they help improving IVF outcome? *Reprod Biol Endocrinol*. 12:107.

Rosen, M.P., S. Shen, A.T. Dobson, P.F. Rinaudo, C.E. McCulloch, and M.I. Cedars. 2008. A quantitative assessment of follicle size on oocyte developmental competence. *Fertil Steril*. 90:684-690.

Rosen, M.P., A.M. Zamah, S. Shen, A.T. Dobson, C.E. McCulloch, P.F. Rinaudo, J.D. Lamb, and M.I. Cedars. 2009. The effect of follicular fluid hormones on oocyte recovery after ovarian stimulation: FSH level predicts oocyte recovery. *Reprod Biol Endocrinol*. 7:35.

Ryu, K.S., I. Ji, L. Chang, and T.H. Ji. 1996. Molecular mechanism of LH/CG receptor activation. *Mol Cell Endocrinol*. 125:93-100.

Salker, M., G. Teklenburg, M. Molokhia, S. Lavery, G. Trew, T. Aojanepong, H.J. Mardon, A.U. Lokugamage, R. Rai, C. Landles, B.A. Roelen, S. Quenby, E.W. Kuijk, A. Kavelaars, C.J. Heijnen, L. Regan, N.S. Macklon, and J.J. Brosens. 2010. Natural selection of human embryos: impaired decidualization of endometrium disables embryo-maternal interactions and causes recurrent pregnancy loss. *PLoS One*. 5:e10287.

Shaw, J.L., F.C. Denison, J. Evans, K. Durno, A.R. Williams, G. Entrican, H.O. Critchley, H.N. Jabbour, and A.W. Horne. 2010a. Evidence of prokineticin dysregulation in fallopian tube from women with ectopic pregnancy. *Fertil Steril*. 94:1601-1608 e1601.

Shaw, J.L., E. Oliver, K.F. Lee, G. Entrican, H.N. Jabbour, H.O. Critchley, and A.W. Horne. 2010b. Cotinine exposure increases Fallopian tube PROKR1 expression via nicotinic AChRalpha-7: a potential mechanism explaining the link between smoking and tubal ectopic pregnancy. *Am J Pathol*. 177:2509-2515.

Sjoblom, C., M. Wikland, and S.A. Robertson. 1999. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes human blastocyst development in vitro. *Hum Reprod*. 14:3069-3076.

Su, M.T., S.H. Lin, I.W. Lee, Y.C. Chen, C.C. Hsu, H.A. Pan, and P.L. Kuo. 2010. Polymorphisms of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor gene and its receptor genes are associated with recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod*. 25:2923-2930.

Thuesen, L.L., A.N. Andersen, A. Loft, and J. Smitz. 2014. Intrafollicular endocrine milieu after addition of hCG to recombinant FSH during controlled ovarian stimulation for in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab*. 99:517-526.

von Wolff, M., Z. Kollmann, C.E. Fluck, P. Stute, U. Marti, B. Weiss, and N.A. Bersinger. 2014. Gonadotrophin stimulation for in vitro fertilization significantly alters the hormone milieu in follicular fluid: a comparative study between natural cycle IVF and conventional IVF. *Hum Reprod*. 29:1049-1057.

Watson, A.J. 2007. Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *Journal of animal science*. 85:E1-3.

Wen, X., A.J. Tozer, S.A. Butler, C.M. Bell, S.M. Docherty, and R.K. Iles. 2006. Follicular fluid levels of inhibin A, inhibin B, and activin A levels reflect changes in follicle size but are not independent markers of the oocyte's ability to fertilize. *Fertil Steril*. 85:1723-1729.

Wirleitner, B., J. Okhowat, L. Vistejnova, M. Kralickova, M. Karlikova, P. Vanderzwalmen, F. Ectors, L. Hradecky, M. Schuff, and M. Murtinger. 2018. Relationship between follicular volume and oocyte competence, blastocyst development and live-birth rate: optimal follicle size for oocyte retrieval. *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 51:118-125.

Zhang, L., N. Yang, J.R. Conejo-Garcia, D. Katsaros, A. Mohamed-Hadley, S. Fracchioli, K. Schlienger, A. Toll, B. Levine, S.C. Rubin, and G. Coukos. 2003. Expression of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor in ovarian carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 9:264-272.

Zhang, M., H. Ouyang, and G. Xia. 2009. The signal pathway of gonadotrophins-induced mammalian oocyte meiotic resumption. *Mol Hum Reprod*. 15:399-409.

Ziebe, S., A. Loft, B.B. Povlsen, K. Erb, I. Agerholm, M. Aasted, A. Gabrielsen, C. Hnida, D.P. Zobel, B. Munding, S.H. Bendz, and S.A. Robertson. 2013. A randomized clinical trial to evaluate the effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in embryo culture medium for in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 99:1600-1609.

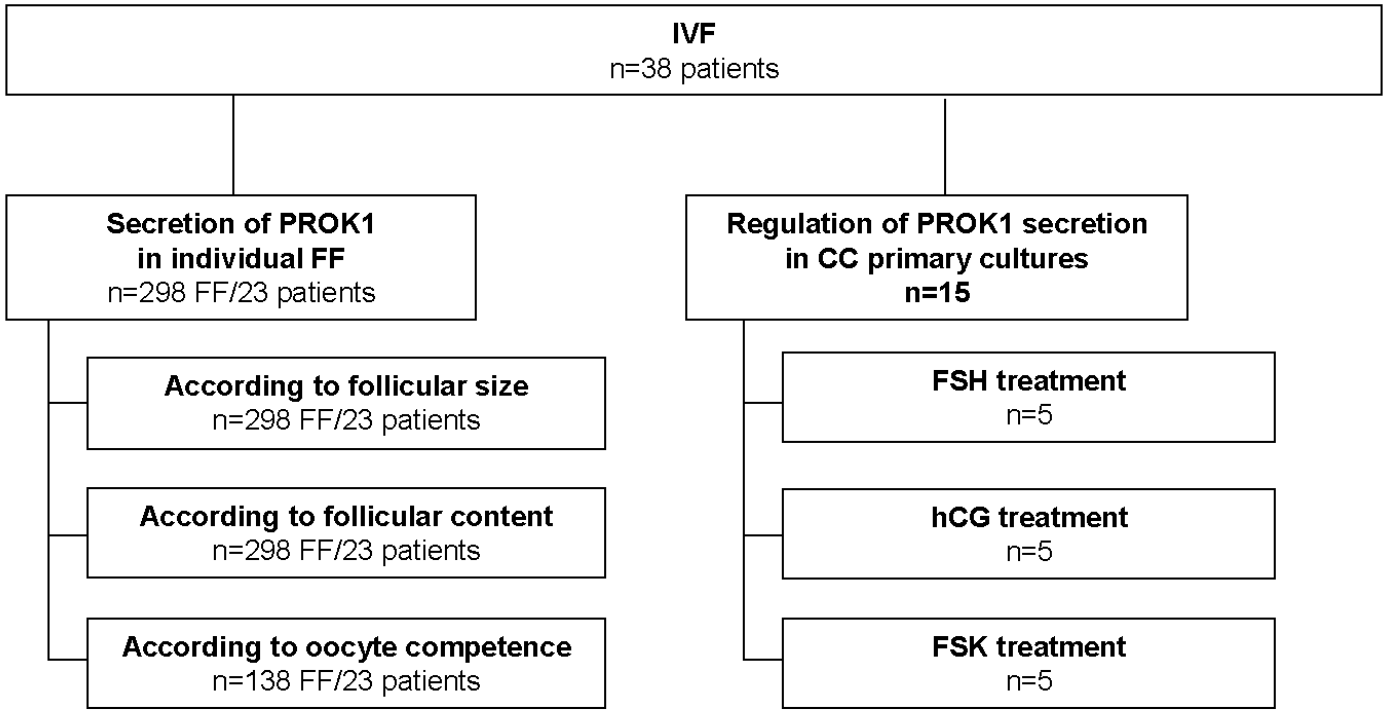


Figure 1. Flowchart of the study group and experiments.
IVF= *In Vitro* Fertilization, FF= Follicular Fluid, CC= Cumulus Cell, FSH= Follicle Stimulating Hormone, hCG= human Chorionic Gonadotropin, FSK= Forskolin.

Characteristics	FF n=23	CC n=15
Women's Age (years)	32.70 ± 0.87	31.88 ± 0.89
Women's Body Mass Index ($kg.m^{-2}$)	22.97 ± 1.01	22.01 ± 0.93
AMH (ng/ml)	3.48 ± 0.45	3.33 ± 0.35
Duration of infertility (years)	4.44 ± 0.46	3.79 ± 0.29
FSH dose (I.U./day)	179.72 ± 12.04	180.06 ± 11.69
FSH treatment (days)	9.86 ± 0.26	10.00 ± 0.30
Retrieved follicles (number)	12.86 ± 0.89	12.66 ± 1.02
Retrieved COCs (number)	7.63 ± 0.82	7.47 ± 0.86

Table 1: *IVF* patient characteristics (mean± SEM).

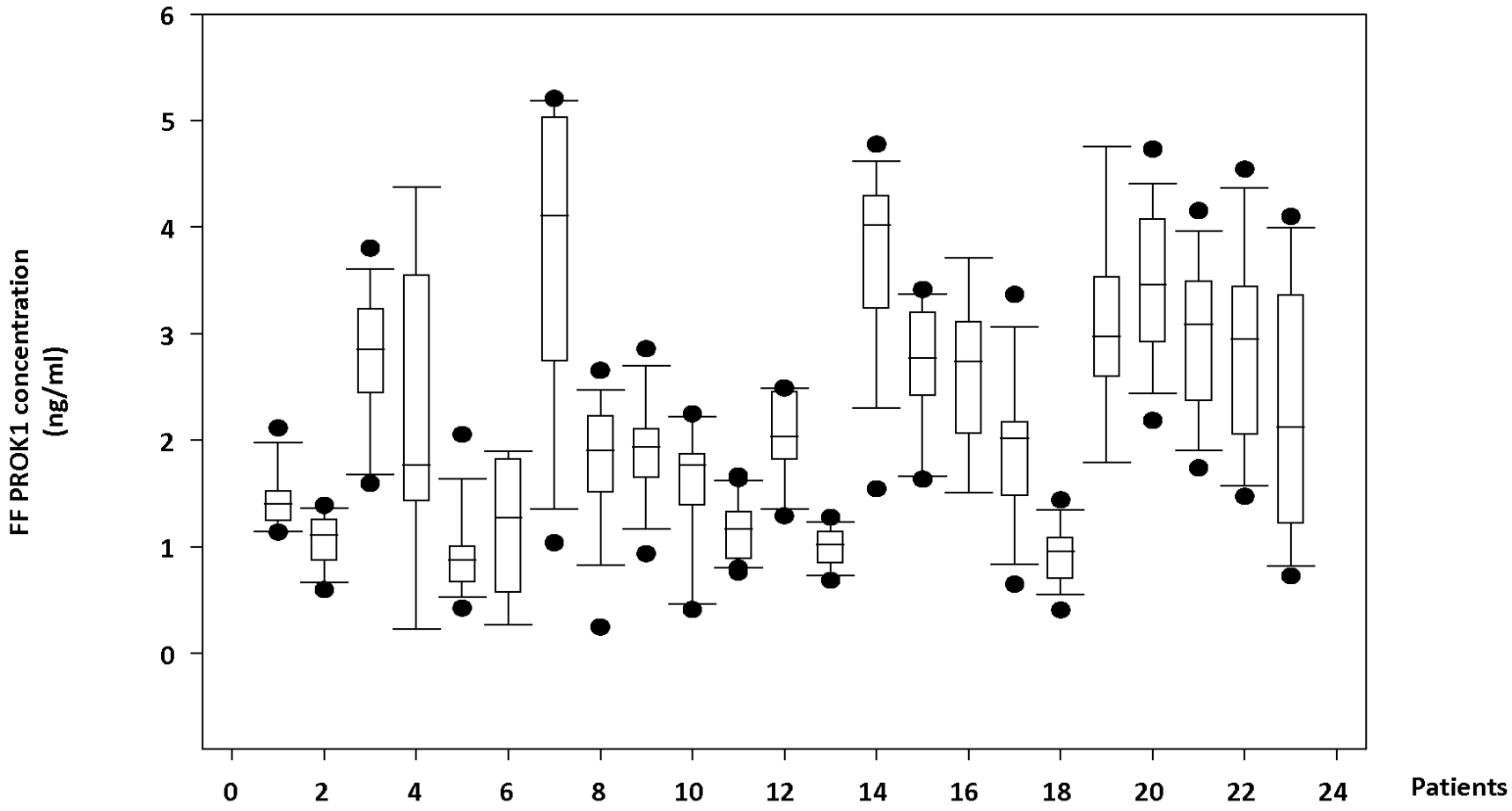


Figure 2. FF PROK1 concentration in IVF patients.
A total of 298 FF samples from 23 women undergoing IVF cycles were analyzed.

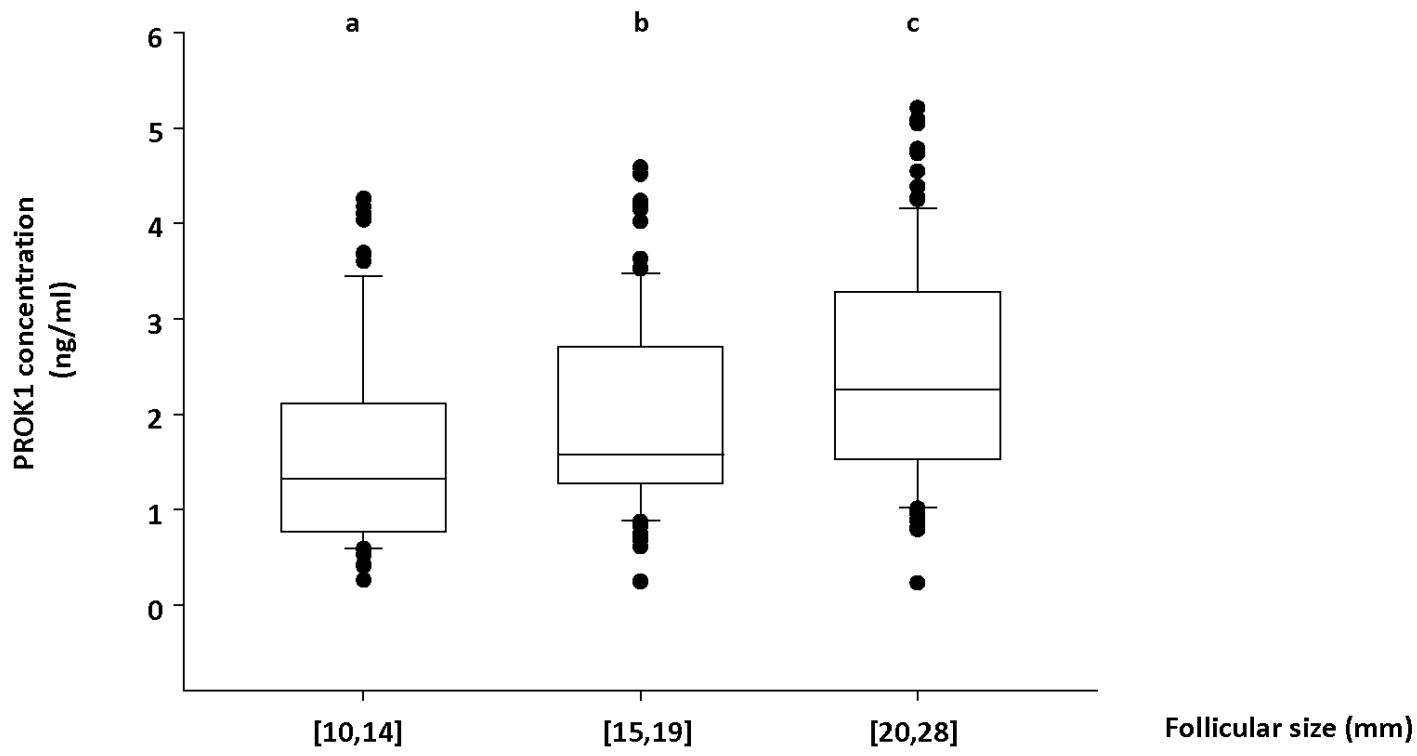


Figure 3. FF PROK1 concentration according to the size of the follicle.
Values overwritten with different letters are significantly different from each other (n=298, ANOVA followed by Dunn's method, $p<0.001$).

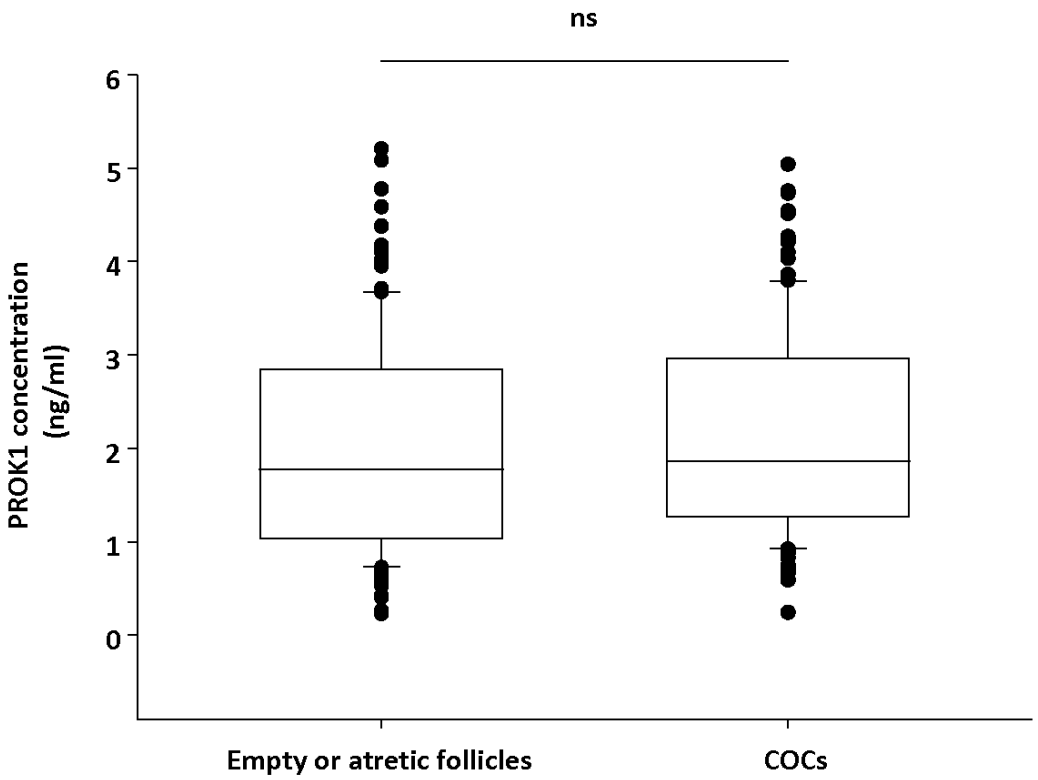


Figure 4. FF PROK1 concentration according to follicular content (n=298, Mann–Whitney U-test, p=0.15). COCs= cumulus oocyte compexes.

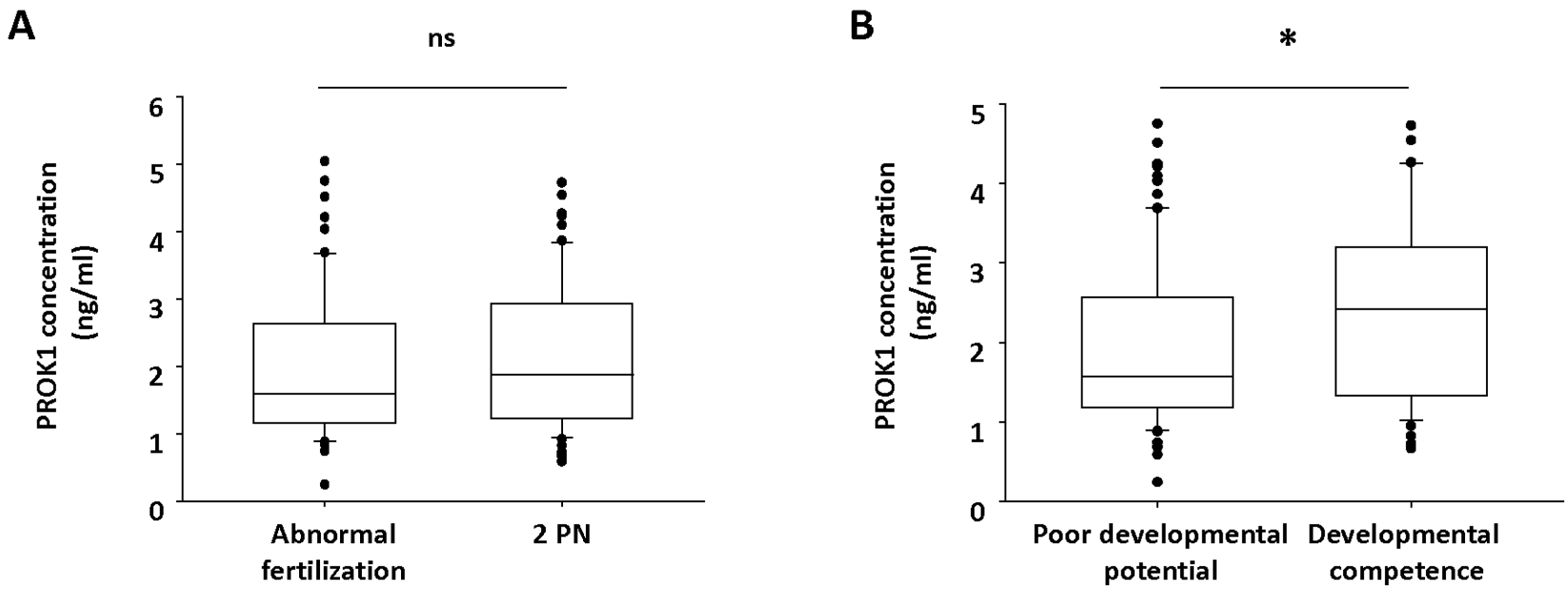


Figure 5. FF PROK1 concentration according to oocyte competence.
A) FF PROK1 concentration according to oocyte competence to achieve fertilization (n=165, Mann–Whitney U-test, p=0.3). **B**) FF PROK1 concentration according to oocyte competence to achieve early embryo cleavage (n=138, Mann–Whitney U-test, * *p* <0.016). PN= pronuclei.

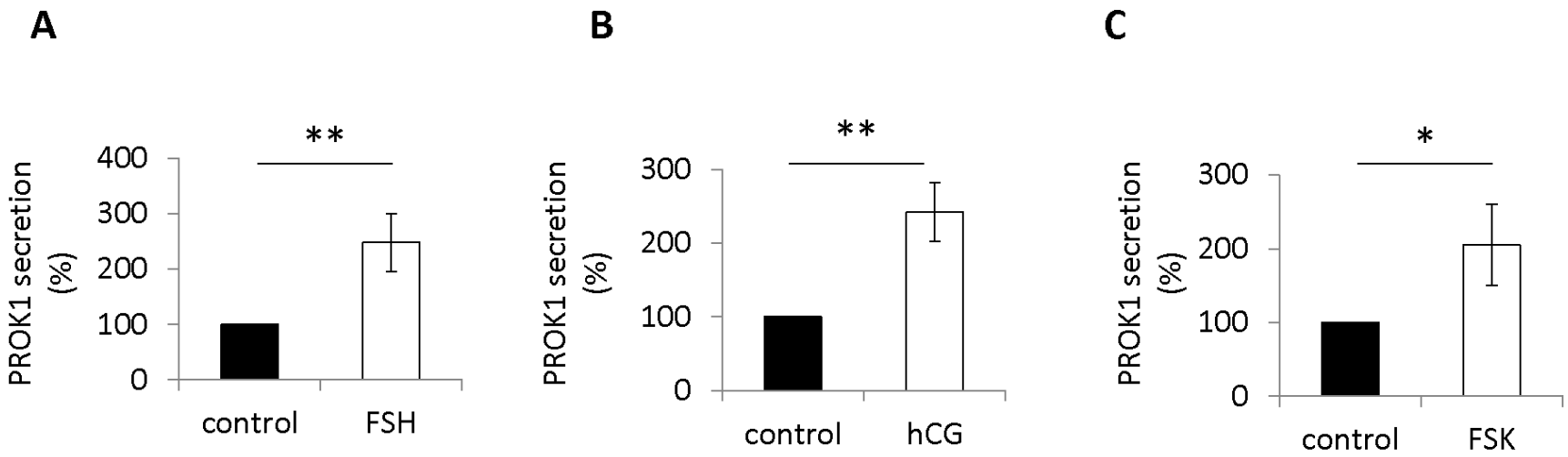
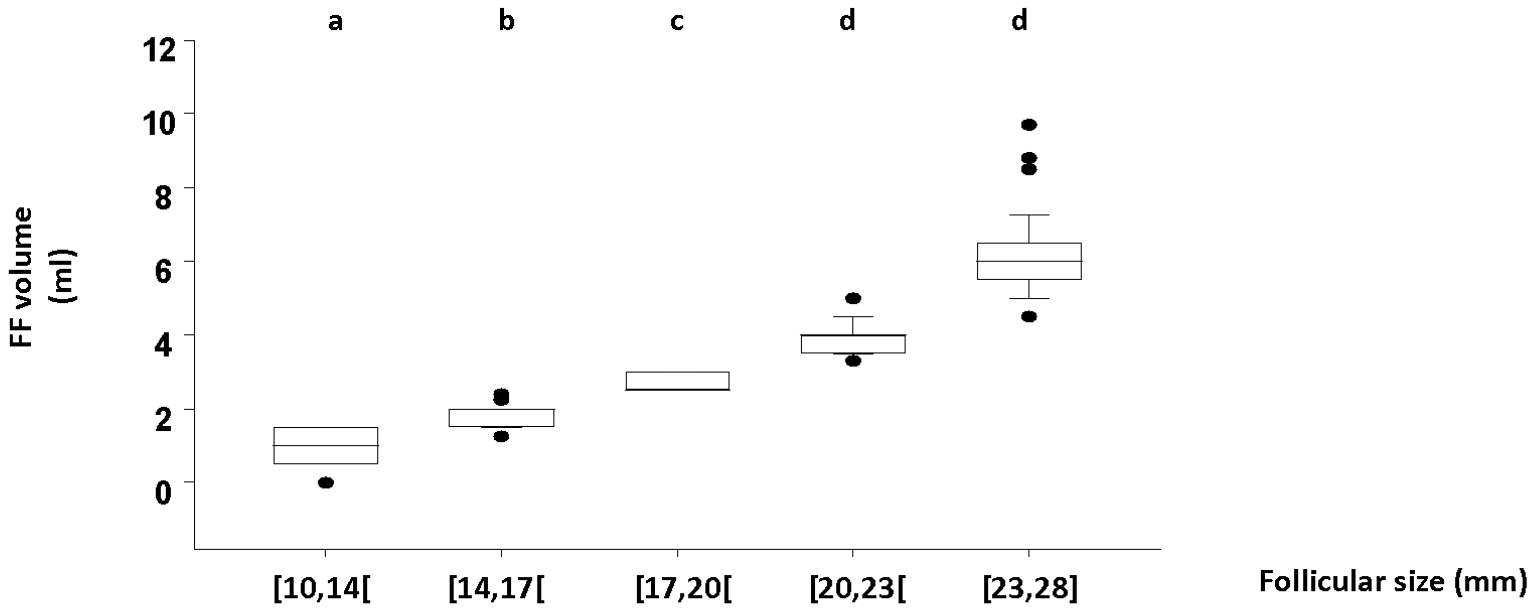


Figure 6. Gonadotropins regulation of PROK1 secretion in human CC primary cultures (n=15). Results are reported as the mean ± standard error of the mean (SEM). **A**) 24h FSH treatment (n=5, Mann–Whitney U-test, ** $p<0.01$). **B**) 24h hCG treatment (n=5, Mann–Whitney U-test, ** $p<0.01$). **C**) 24h FSK treatment (n=5, Mann–Whitney U-test, * $p<0.05$).



Supplementary figure 1. FF volume according to the size of the follicle.

Values overwritten with different letters are significantly different from each other (n=298, ANOVA followed by Dunn's method, p<0,001).

Annexe 4 : Article 5

Casein Kinase 2 contributes to trophoblast invasion: physiological and pathological implications.

Cet article est le fruit d'une collaboration entre notre groupe, spécialisé dans l'étude du placenta, et le groupe du Dr O. Filhol, spécialisé dans l'étude de l'enzyme CK2.

J'ai travaillé en étroite collaboration avec le Dr R. Abi Nahed, d'où ma position en tant que deuxième auteur.

Protein kinase CK2 contributes to trophoblast invasion: physiological and pathological implications.

R. Abi Nahed[1,2,3*], D. Reynaud[1,2,3], S. Lartigue[1,2,3] , C. Roelants[1,2,3], D.Vaiman[4] , M. Benharouga[2,3,5], C. Cochet[1,2,3] , O. Filhol[1,2,3#], N. Alfaidy[1,2,3#]

Brief title: CK2 controls trophoblast invasion

1. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 1036, Grenoble, France

2. Université Grenoble-Alpes, 38000, Grenoble, France

3. Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA), Biosciences and Biotechnology Institute of Grenoble, Grenoble, France

4. Genomics, Epigenetics and Physiopathology of Reproduction, Institut Cochin, U1016 Inserm- UMR 8104 CNRS - Paris-Descartes University, Paris, France.

5. Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 5249, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, Grenoble, France

[#] Equal contribution

Total number of words:

The authors declare no potential conflicts of interest.

*Corresponding author: Roland Abi Nahed

Unité INSERM U1036. Laboratoire BCI -BIG

CEA Grenoble 17, rue des Martyrs

38054 Grenoble cedex 9

Tel. 07 70 27 17 04

Fax 04 38 78 50 58

rolandabinahed@gmailcom

Abstract

Preeclampsia (PE) is the most threatening pathology of human pregnancy. PE development is thought to be due to a failure in the invasion of trophoblast that establish the fetomaternal circulation. Protein kinase CK2 is an ubiquitous enzyme reported to be involved in the control of cell invasion. CK2 consists of two subunits; a catalytic subunit, CK2α, and a regulatory subunit, CK2β. To date, no data exist on the expression and role of this enzyme in normal and PE pregnancy. We performed studies on clinical cohorts [distinctive cohorts from early pregnancy (n=24) and from PE (n=10) and age-matched controls (n=18)]; in vitro on primary and trophoblast cell lines); ex vivo using placental explants, and in vivo with the Stox1 mouse model that mimics PE. We demonstrated that i) CK2 is more expressed during the late first trimester of pregnancy and mainly localized in differentiated trophoblast cells ii) the inhibition of its enzymatic activity decreases the proliferation, migration and invasion of trophoblast cells, both in 2D and in 3D culture systems, iii) CK2 activity and the CK2α/CK2β protein ratio were increased in PE human placentas. The pattern and profile of CK2 expression were confirmed in gravid mice along with an increase in the PE mouse Stox1 model. Altogether our results demonstrate, for the first time, that CK2 plays an essential role in the establishment of the feto-maternal circulation and that its deregulation is associated with PE. The increase in CK2 activity in PE might constitute compensatory mechanism to ensure proper pregnancy progress.

Introduction

Pre-eclampsia (PE) is a disease that complicates 2 - 8% of all pregnancies, resulting in significant maternal and fetal morbidity (Abalos et al., 2013). The disease manifests in the third trimester of pregnancy with a wide variety of maternal symptoms, of which hypertension, proteinuria, and edema are late manifestations of a multifactorial, multisystemic disorder initiated in early pregnancy (Cross, Werb & Fisher, 1994).

In early first trimester, placentation occurs in relatively hypoxic conditions critical for proper embryonic development (Burton et al., 2002). Before the ninth week of gestation (Wg), placental oxygen tension is low (20 mm Hg), and at 9–10 Wg it increases to approximately 55 mm Hg (Wells, 2007). This rise coincides with morphological changes in the uterine arteries that allow free flow of maternal blood into the placenta. At this time trophoblast cells transit from a proliferative to an invasive phenotype (Cartwright et al., 1999), penetrate endometrial vessels, and establishe the feto-maternal circulation (Kaufmann et al., 2003). This gestational period is associated with increases in the activities of the antioxidant enzymes such as catalase, glutathione peroxidase, manganese and copper/zinc superoxide dismutase within placental tissues, signifying an oxidative stress generation. This period has also been shown to be associated with significant derangement of the mitochondrial cristae within trophoblast cells, a phenomenon reported by multiple studies as adaptation of trophoblast cells to the burst of oxygen tension. It has also been reported that inabilities to switch on these adaptations during times of mitochondrial stress may contribute to the development of neuronal and cancer pathologies. Hence, one can speculate that in the placenta the oxygenation burst may trigger mitochondrial adaptations to overcome the generated oxidative stress. However, the mechanisms by which this might occur is still to be determined. Among proteins that have been reported to be associated with mitochondrial adaptations is the protein kinase (CK2). CK2 (previously named casein kinase 2) is a ubiquitous enzyme that phosphorylates a wide repertoire of substrates on serine / threonine residues (Bibby et al., 2005). Such promiscuity connects CK2-dependent phosphorylations with key cellular processes and signaling pathways such as survival/proliferation, cell differentiation and apoptosis (St Denis et al., 2009; Ortega et al., 2014; Buchou et al., 2003; Ahmed et al., 2002; Filhol et al., 2015). The CK2 holoenzyme is a tetramer complex composed of two catalytic subunits α or α '(42 and 38 KDa) and two β-regulatory subunits (25 KDa) which modulate its catalytic activity (Pinna, 2002 ; Zanin et al., 2015; Bibby, 2005 ; Montenarh et al 2014 ; Buchou et al 2003).

While the regulatory subunit (CK2β) is not essential for the enzymatic activity of CK2α, the free catalytic subunit and the holoenzyme exhibit divergent substrate preferences (Pinna, 2002). Moreover, analysis of the spatiotemporal organization of the CK2 subunits using live-cell imaging revealed the existence within the cell, of a subtle equilibrium between different forms of CK2 subunits (Filhol et al., 2003). Consequently, the CK2α/CK2β ratio is critical to maintain a normal epithelial morphology and an imbalance of CK2 subunit expression reflected by a decrease in the CK2β regulatory subunit is sufficient to drive epithelial-to-mesenchymal transition (Deshiere et al., 2013). CK2 participates to the transduction of survival signals and the emerging picture is that this kinase is central to many of the molecular switches that protect the cell against stress (Ahmed et al., 2002; Watanabe, 2012). Importantly, CK2 has the properties of an anti-stress factor (Watanabe, 2012). While the regulatory subunit (β) is not essential for the enzymatic activity of the CK2, the CK2α/CK2β ratio appears to be essential for the stability of this enzyme (Filhol, 2015). Importantly, CK2 inhibition has been reported to cause mitochondrial dysfunction and to exacerbate oxidative stress damage, suggesting that this enzyme could be a first line of defense in the cellular antioxidant defense pathway, such as the one that occurs around 9-10 Wg in the human placenta (Kim et al., 2012 ;Sheoran S et al., 2013).

While CK2 has been studied in multiple diseases, such as cancer, where the inhibition by specific chemical inhibitors, such as CX4945, is considered as a promising therapy (Siddiqui-Jain et al., 2010; Filhol et al., 2015) in multiple pathologies, neither its role in early placental development nor its behavior in pregnancies pathologies such as pre-eclampsia, a disease associated with failure in placental adaptations to oxygenation by the end of first trimester of pregnancy, has been investigated.

Based on the commonly recognized functions of CK2 to (***i***) contribute to mitochondria adaptations, (***ii***) play a role in the cellular antioxidant defense and (***iii***) regulate cell proliferation migration and invasion, we hypothesized that this enzyme may play an important role in the mechanisms that support the establishment of the feto-maternal circulation and control PE-associated oxidative stresses.

To investigate the role of CK2 in normal and PE-associated pregnancies, studies were conducted both *in vitro* using human placenta and trophoblast cells, a clinical cohort of PE placental samples and *in vivo* using the STOX1 mouse, a genetic model of PE that recapitulates all hallmarks of the disease. The results presented here show that placental CK2 plays a critical role during the first trimester of pregnancy and its dysregulation contributes to altered placental development and fetal outcome.

Materials and methods

Human tissue collection

Collection and processing of human placentas were approved by the local hospital ethical committees. Informed patient consent was obtained in all cases. First trimester human placentas from 6–13 weeks of gestation (Wg) were obtained from elective terminations of pregnancies from Grenoble Hospital. PE and gestational age-matched controls placentas were collected between 22 and 28 Wg.

PE was defined as a diastolic arterial blood pressure greater than 90 mmHg and a systolic blood pressure greater than 140 mmHg, associated with proteinuria (more than 300 mg/24 hrs). The blood pressures were taken at admission and at the inclusion day, after at least half an hour of bed rest. From this study, we were able to collect 24 samples of PE patients and 32 samples from normal pregnancies. All control placentas obtained were grossly normal. Placentas were obtained within 20 min of delivery. Placental tissue samples were excised from random areas of the placental cotyledons, excluding the peripheral margin and infarcted areas. Samples from each placenta were snap frozen and stored at -80 °C for mRNA and protein extraction or fixed in 4 % paraformaldehyde for immunohistochemical analyses.

Animal model

Animal studies were carried out in strict accordance with the recommendations and the guidelines of the European Community for the Use of Experimental Animals. We used both gravid C57bl6 strain at the following gestation ages: 10.5, 14.5 and 17.5, days post coïtus (dpc) and the FVB/N strain STOX 13 mice (mice overexpressing 13 times the STOX1 gene). These mice were obtained from Dr. Vaiman (Doridot et al., 2013). Female WT mice (n= 4) were crossed with STOX13 male mice (n=4) to generate heterozygote pups. For controls, we crossed FVB/N WT female mice (n=4) with male mice (n=4). The mice were housed under controlled illumination (12:12h light: dark cycle). The date of the presence of a vaginal plug was considered as day 0.5 post coitus (dpc). Gravid STOX13 mice were sacrified at day 15.5 dpc.

Cells and explants cultures (PEX)

HTR8/SV neo *culture*

The human Normal trophoblast cell line, HTR8/SVneo (ATCC® CRL3271™), were used between 24 and 30 passages and grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin, and amphotericin B (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). The cells were incubated in the absence or presence of 4 µM CX4935 (CX), a potent inhibitor of the enzymatic activity of ck2, for 24 h. Cells were maintained at 37°C under 5% CO_2 and 20 % O_2.

STOX1 cell line and Control cell line culture

The human trophoblast cell line JEG 3 that overexpresses STOX1 gene was obtained from Dr. Vaiman. The overexpressing cell line was called STOX1 cells. The control cells are JEG3 cells that were transfected by a control plasmid, they were called CTL. Cells were stably transfected with pCMXSTOX1- or empty pCMX respectively (Rigourd et al., 2008). Geneticin (G-418, 500 µg/ml, Invitrogen) was continuously used to maintain transgenic cell line in culture. STOX1 cell and CTL cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) glutamine, containing 10% fetal bovine serum (FBS), 1% antibiotic–Penicillin Streptomycin. Cells were incubated in a humidified 5% CO2 at 37°C.

Human Placental explant (PEX culture)

Villous explant cultures were established from first trimester human placentas from 7–12 Wg. Small fragments of placental villi (30–40 mg) were placed into 48-well plates precoated with 150 µl/well of diluted Matrigel (Matrigel/DMEM-F-12, 1:1; Corning® Matrigel® Basement Membrane Matrix #354234) and polymerized at 37°C for 30 min. Explants were cultured in DMEM Ham's F-12 medium (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 1% streptomycin/penicillin. After 24 h of culture the medium was changed and the explants were transfected with either siRNA against CK2α (Filhol., 2012) or scramble siRNA, used as control (Ambion, France). Lipofectamine RNAimax (Invitrogen, California) was used as transfecting agent according to the manufacturer's instruction. The explants were incubated in the absence or presence of 2 or 4 µM CX for 24 h. For each placenta, three explants were used for each determination. For statistical analysis, the n value represents the number of placentas and not explants used.

RNA isolation and real-time PCR analysis

Total RNA was extracted from PE, AMC, cell lines, first trimester placentas and mice placental tissue using the Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) as described (Brouillet et al., 2010). Reverse transcription was performed on 1 µg of total RNA (Invitrogen). Primers used are listed in Table 1. mRNA expression was quantified by real-time RT-PCR using a Bio-Rad CFX96 apparatus and GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI). PCR conditions were as follows: step 1, 94°C for 10 min; step 2, 45 cycles consisting of 95°C for 15 s, with temperature indicated in Table 1 for 5 s, and 72°C for 10 s. Relative quantification was performed using the comparative threshold (CT) method after determining the CT values for reference and target genes in each sample sets according to the $E^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Three humans (*18S, RPL0* and *GAPDH*) and two mice (*RPL13a* and *GAPDH*) normalizing genes, , were used to calculate the mRNA levels (**Table 1**).

Immunohistochemistry

Placental tissues from first trimester (6 to 14 Wg) and from PE and AMC were fixed for 24 h at 4°C in 4% (vol/vol) paraformaldehyde, embedded in paraffin, and cut into 5-µm sections. The avidin-biotin immunoperoxidase detection method was applied. Endogenous peroxidase activity was quenched by pretreatment with 3% (vol/vol) hydrogen peroxide in methanol for 30 min. polyclonal rabbit antibodies were used to detect CK2α protein (Laramas, 2007) and Monoclonal mouse antibodies were used to detect CK2β protein (Prudent, 2010 ; Deshiere 2013). For immunohistochemical analyses, antibodies were incubated with the tissue sections overnight at 4°C (1µg/ml). Tissue sections were subsequently washed three times with PBS and incubated with biotinylated goat anti-rabbit IgGs or goat anti-mouse IgGs (1,1g/l, Dako, Denmark) for 1 h in a humid chamber. After three PBS washes, the slides were incubated with an avidin-biotin complex (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA) for 1 h. After a final PBS wash, the immunoreactive proteins were visualized upon addition of 3, 3-diaminobenzidine (Dako) for 2 min and then counterstained with hematoxylin. Zeiss AxioCam HRc coupled to a Zeiss Axioplan microscope were used.

Western Blotting analysis

Placental tissues and cell line used to determine the expression of CK2 protein were homogenized with a mixer (Polytron 1200 mixer, Bioblock Scientific, France) in RIPA lysis buffer (Tris-HCl 2,42g, NaCl 8,77g, sodium deoxycholate 5g, sodium dodecyl sulphate (SDS) 1g, Triton X-100 10ml, pH 8) containing a cocktail of protease inhibitors (Sigma 105 Aldrich, MO). The supernatants obtained by centrifugation of homogenates (11,000 g at 4°C for 30 min) were collected and protein concentrations were determined using the micro BCA protein assay with a Multiscan EX (Thermo LabSystems) and Accent Software 2.6.

Extracted proteins were mixed with 5X protein sample buffer (62 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% ß-mercaptoethanol, and 0.05% bromophenol blue as the tracking dye), and samples were heated at 95°C for 5 minutes. Samples were then separated on 4–20% SDS-PAGE gels and transferred into 0.22 µm nitrocellulose membranes (BioRad) using a Mini Trans-Blot Cell (BioRad). The membranes were blocked in 1% BSA-TBS Tween 0,05% and incubated overnight at 4°C with anti-CK2α (1:1000, in-house antibody (Laramas, 2007), anti-CK2β (1:300; Deshiere, 2013), anti-PAkt Ser129 (1:500; Sigma-Aldrich); this was followed by 5 washes and then incubated for 1 h with matched horseradish peroxidase labeled secondary antibodies (1:3000). Immunoreactivity was detected using chemiluminescence detection kit reagents and a Chemi-Doc imaging system (BioRad). To standardize for sample loading, the blots were subsequently stripped using a commercially available kit, following the manufacturer's instructions (Re-blot; Millipore), and re-probed with an anti-β-actin antibody (Sigma-Aldrich) used as loading control.

Proliferation Assay (incucyte)

Cell proliferation was assessed in the absence or presence of CX-4945 (4µM). Cells were seeded at 5000 cells/well in a 96 well plate, and allowed to grow for 24 h. Cells were then treated or not with CX-4945 and incubated 72 h in the Incucyte device. The cells were tracked using an Essen IncuCyte Zoom live-cell microscopy incubator, and bright field images were captured every 2 h for the duration of the experiment. The proliferation rate was analyzed using Zoom® software.

Migration Assay (wound healing test)

Wound-healing assay was performed using HTR-8/SVneo cells. Cells were seeded in complete medium (RPMI, 5% FBS) at a density of 2 x 10^5 cells/well into 24-well plates. At confluence, complete medium was replaced by serum-free medium in the absence or presence of CX-4945. Cells were scratched with a WoundMaker-incuCyte (Essen BioScience) to create an artificial wound and incubated 72 h in the Incucyte device. Images and kinetics of the wound closure were recorded every 2 h. The percentage of wound closure was analyzed using Zoom® software.

Invasion Assay

The invasive properties of HTR8/SVneo cells treated with of CX-4945, 4 µM, were compared to CTL cells using Matrigel-coated HTS FluoroBlok transwell inserts (Falcon, 0.8 µm) were used. Matrigel™ (8 mg/ml diluted at 1:3 with DMEM) was added to the transwell inserts and was allowed to solidify for 2 h at 37°C. Cells were pre-labelled *in situ* for 1 h with 2 µg/ml of DiI-Ac-LDL, (Acetylated Low Density Lipoprotein, labelled with 1,1\'-dioctadecyl – 3,3,3\',3\'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate). Labeleld-cells were then trypsinized and re-suspended to the upper chamber of Matrigel-precoated FluroBlok transwell (3x10^5 cells).

Coated fluoroBlok transwell inserts were also used to determine the number of cells that invaded the Matrigel towards the chemoattractant (10% FBS) that was added to the lower side of the chamber. The FluoroBlok transwell was incubated for 48 h at 37°C. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde during 15 min at room temperature. Remaining cells at the upper side of the membrane were carefully removed with cotton swabs. The cells that invaded the chamber were visualized under the epifluorescence microscope (in red) and counted using ImageJ software.

CK2 kinase assay

CK2 kinase assays (Bestgen et al., 2017) were performed in a phosphorylation buffer (50mM Tris-HCl pH7.5, 0.15 M NaCl, 2% glycerol) containing recombinant CK2α (36 ng) or recombinant CK2 holoenzyme (50 ng) and a mixture containing 10 mM $MgCl_2$, 1 μCi of [γ-^{32}P] ATP in the presence of 0.2 mM of the CK2β independent substrate RRREDEESDDEE (Songyang et al., 1996) or the CK2β-dependent substrate SGDEMIFDPTMSKKKKKKKKP (Poletto et al., 2008). The final concentration of ATP was 10 μM and assays were performed under linear kinetic conditions for 5–10 min at room temperature. Kinase reactions were stopped by the addition of 60 μL of 4% trichloroacetic acid and sample adsorption on phosphocellulose P81 paper, which were washed in 0.5% phosphoric acid and counted in a scintillation counter.

Statistical Analysis

Statistical comparisons were made using the Student's t-test. All data were checked for normality and equal variance. When normality failed, a nonparametric test was used. (SigmaPlot and SigmaStat, Jandel Scientific Software). All data are expressed as means Mean ± SEM ($P<0.001$, 0.01 and 0.05).

Results

CK2 expression and activity in human placenta during the first trimester of pregnancy.

Immunohistochemistry

Eight to fourteen Wg placentas were used to immunolocalize CK2 subunits in human placental villi. CK2α and CK2β immunoreactivity was mainly observed during the late first trimester (Fig.1 Ab-Ae). Before this gestational age, the overall staining was weak (Aa-Ad). In the late stages of gestation, a strong CK2α and CK2β staining was observed in the cytotrophoblast (CT) (Fig.1 Ab-Ae), syncytiotrophoblast (ST) (Fig1 Ab-Ae) and extravillous CT (EVT) (Fig.1 Ac-Af). An immunoreactivity for both CK2 subunits was also observed in Hofbauer cells (Hb) within the placental villi (Fig.1 Ab-Ae). No staining was observed when pre-immune sera was used as negative control (Fig.1 Ag).

Western blot and qPCR analysis

The pattern of CK2α and CK2β protein expression was analyzed by Western blot on protein extracts from human placental tissue homogenates. **Fig.1B** shows a representative Western blot of CK2 subunit expression in placental extracts of 6 to 13 Wg. The bands corresponding to the CK2 subunits were stably expressed at 6-8 Wg. Wg, and increased gradually thereafter. Importantly, we observed a peak of expression of both subunits at 9-10 Wg, at a time corresponding to the feto-maternal circulation establishment, suggesting a potential regulation of CK2 expression at this gestational age. Comparable results were obtained when CK2α and CK2β expression was assessed throughout mouse gestation in placenta collected from 10.5 dpc (day post coïtus) to 17.5 dpc (**Fig.S1.A)**. Quantification of Western blots revealed a sharp increase in both CK2α and CK2β expression levels during late first trimester. Because it is well established that the CK2α to CK2β ratio has a strong impact on the substrate-dependent modulation of this kinase, we compared this parameter between early and late first trimester. No change in this ratio was observed between these gestational periods **(Fig.1 C)**. This was also the case when considering the ratio of CK2 subunits expression throughout mouse gestation, **(Fig S1.B)**. The increase in the levels of CK2α and CK2β protein expression was also confirmed at the mRNA level, both in human and mouse samples **(Fig.1D and FigS1.C).**

CK2 catalytic kinase activity

To determine whether the increase in CK2 protein expression was correlated with its activity, we compared CK2 kinase activity in placental samples collected during the first and late first trimester. **Fig. 1E** shows a significant increase (x 2.5 fold) in the CK2 enzymatic activity during the late first trimester compared to the early first trimester.

CK2 controls trophoblast proliferation

To determine the potential involvement of CK2 in trophoblast proliferation, we compared the proliferation of HTR8 SV/neo cells in the absence or presence of CX-4945 (CX), a potent CK2 inhibitor of the CK2 activity. Fig. 2A shows that the CK2 inhibition with 4 µM of CX-4945 causes a significant decrease in the proliferative rate of HTR cells, suggesting that CK2 catalytic activity is involved in trophoblast proliferation. This 4 µM concentration of CX-4945 was chosen because it inhibited CK2 activity at 80% (Fig. S2A) and this treatment for 40 h did not induce any harmful effect, as assessed by cell death rate (Fig.S2.B), nor did it affect the CK2α and CK2β expression (Fig. S2.C). However, this CX-4945 concentration led to a significant decrease of AKT phosphorylation on Ser 129, confirming a CX-4945-mediated CK2 activity in HTR cells inhibition (Fig. S2.C).

CK2 activity is involved in EVT migration and invasion.

Because trophoblast migration and invasion processes are important for the establishment of the feto-maternal circulation, we compared the migration of HTR cells in the absence or presence of CX-4945. **Fig. 2B** shows that inhibition of CK2 activity affects EVT migration capacity. This effect that was significant after 24 h of culture, suggests that CK2 activity positively controls trophoblast migration. We then determined the potential involvement of CK2 on trophoblast invasion. Using the transwell assay we compared HTR8 SV/neo invasion in the absence or presence of CX-4945. As shown in **Fig. 4C and 4D,** there was a significant decrease in the invasion of HTR8 SV/neo cells upon CK2 inhibition, suggesting that this kinase is directly involved in the process of trophoblast invasion.

Role of CK2 on EVT invasion using the placental explant (PEX) model

We also investigated the role of CK2 on EVT outgrowth and invasion in the villous explant system. The *ex vivo* 3D culture of PEX has the advantage of being closer to human physiology respecting the topology of intact villi and closely mimic the formation of anchoring villi occurring *in vivo* by the end of the first trimester of pregnancy. PEX were cultured on Matrigel, until the appearance of extravillous trophoblast columns at the end of the villi (T0). Both siRNA-mediated CK2α silencing strategy and inhibition of CK2 activity were employed. Fig. 3A shows representative images of placental villous tips at T0 and 72h of culture later in the presence or reduced expression or activity of the CK2α protein. In the control condition there was an outgrowth of EVT from the distal end of the villous tip and migration of trophoblast cells into the matrigel. In contrast, when CK2 expression was knocked-down, EVT cells signigicantly lost their invasive capacity compared to the scramble condition (Fig. 3B). The graph in Fig. 3C reports a validation of CK2α mRNA expression upon PEX transfection with CK2α-siRNA siRNA. Fig. 3D shows the effect of the inhibition of CK2 activity on EVT invasion in the PEX model. At T0, all explants showed significant budding and the appearance of EVTs at the tip of the villi. At 72h of culture, an ongoing invasion process was only observed in control explants whereas CX-4945-treated explants were stopped in their invasion (Fig. 3E). As for cell treatment with the CX inhibitor, we also confirmed that at 4μM, CX-4945 inhibited CK2 activity by more than 80% (Fig 3F), without affecting the protein expression levels of CK2α and CK2β (Fig. S2.D). Importantly, at this concentration, CX-4945 damped AKT phosphorylation at Serine 129, a target for CK2 (Fig. S2.D). Altogether, the aforementioned findings strongly suggest that CK2 has an essential role in placental development during the first trimester of pregnancy providing good reasons to believe that deregulations in its expression and/or activity might be associated to the offset of pregnancy pathologies such as preeclampsia.

Both activity and expression of CK2α are increased in PE placentas

Here, we compared CK2 expression, as well as its activity in placentas collected from PE and AMC placentas. **Fig. 4A-E** demonstrate that CK2α mRNA, protein and activity were significantly increased in PE placentas compared to AMC. No significant changes were observed for CK2β expression (**Fig. 4B-C**).

Importantly, we observed that the CK2α/CK2β protein ratio was significantly increased in PE placentas (**Fig. 4C**). The increase in CK2α expression was confirmed by immunohistochemistry. **Fig. 4E** shows representative staining for CK2α and CK2β protein at 26 Wg. Strong CK2α immunoreactivity was observed in the syncytiotrophoblast of the preeclamptic placentas compared to the AMC. Altogether, these data suggest that a dysregulation in the normal functioning of CK2 is associated with PE.

CK2α exhibits the same pattern of expression and activity in the genetic model of preeclampsia, the stox1 mice model.

CK2α expression in the STOX1 mouse and trophoblast cell models

To substantiate the demonstration of an upregulation of CK2α in preeclamptic placenta, we compared the expression and activity of this enzyme in the relevant models of PE, ie, STOX1 mouse model and the trophoblast overexpressing cells, STOX1 cells. A representative Western blot analysis of CK2α and CK2β expression in placental extracts collected from WT and STOX1 gravid mice at day 15.5 dpc (**Fig.5A)** and the quantification of their expression (**Fig.5B)** show that the expression of CK2α was increased in Stox1 placentas compared to the controls. However, the CK2α/CK2β ratio was significantly increased in STOX1 placentas (**Fig 5.B**). This increase in the CK2α protein expression was associated with a significant increase in its catalytic activity **Fig. 5C.**

To determine whether the increase in CK2 expression and activity in STOX1 placenta was due to an increase in the trophoblast unit, we analyzed CK2 expression and activity in STOX1 trophoblast overexpressing cells. **Fig. 5D** shows a representative Western blot of CK2α and CK2β expression in STOX1 cells compared to control cells and the quantification of the levels of their protein expression, **Fig.5E.** Consistent with the CK2 expression in STOX1 placenta, we observed an increase in CK2α expression (**Fig.5D, E**) and activity (**Fig.5F**) in STOX1-expressing cells; no change was observed for CK2β expression while the CK2α/CK2β ratio was significantly increased **(Fig.5E).**

Altogether these data demonstrate that trophoblastic CK2 is deregulated in preeclampsia. Further studies are needed to determine whether this dysregulation is a cause or consequence of the disease.

Discussion

The present report is the first to demonstrate that CK2 is a critical player for placental development during the first trimester of human pregnancy and that its expression levels and activity are highly increased in the most threatening pathology of human pregnancy, preeclampsia. This contention is based on three observations. First, the temporal increase in CK2 expression demonstrated by immunohistochemistry and Western blot analysis coincides with the burst in the oxygen tension in the placenta at about 9-10 Wg. This finding suggests that enhanced CK2 activity may accompany the developmental placental switch during this major gestational period. Second, CK2 controls key developmental processes in the placenta, such as trophoblast proliferation, migration and invasion. The control of these processes by CK2 highlights the importance of this enzyme in the success of the pregnancy. Trophoblast cell invasion of is the major process in the establishment of the foeto-maternal circulation, as limited invasion of these cells is associated to PE development. Importantly, histological examination of placental bed biopsies from PE women has revealed limited trophoblast migration to maternal decidua, reduced trophoblast invasion of maternal spiral arteries, and failure of uterine artery remodeling (Strickland & Richards, 1992). This suggests that increased expression of CK2 in PE may be a compensatory phenomenon established to overcome the reduction in trophoblast migration and invasion. Third, we demonstrated that these observations are not specific to human placenta as the same CK2 pattern and profile were observed in normal mouse placenta, along with an increase in the expression and activity of this enzyme in the mouse STOX1 preeclamptic model.

In normal pregnancy, we demonstrated that the CK2α/CK2β ratio of CK2α to CK2β did not change throughout gestation, suggesting that the expressions of both subunits are coordinately regulated under physiological conditions. In contrast, in the preeclamptic condition, the ratio was significantly increased, suggesting a failure in the maintenance of an equilibrium between CK2α and CK2β levels. However, this deregulation did not affect the overall enzyme activity, as significant increase in CK2 activity was observed. Both PE human placentas and STOX1 placentas displayed increased CK2 activity that was associated with a significant increase in the CK2α/CK2β ratio. These observations suggest a failure in the maintenance of this closely balanced equilibrium between CK2α and CK2β expression in preeclamptic conditions. As a result, the observed overexpression of free CK2α may lead to a shift in the balance of phosphorylated CK2α- and holoenzyme- specific substrates, thereby influencing the functions of selected proteins within the cells. Therefore, the involvement of CK2 in the development of

PE might be explained by a perturbation in the CK2α/CK2β ratio that would go on further to develop PE. Previous studies from our group reported that unbalanced expression of CK2 subunits in breast carcinoma upon a knockdown of CK2β have led to epithelial-to-mesenchymal transition, a phenomenon that participates in the molecular circuits of tumor propagation (Deshiere, 2013; Filhol, 2015, Duchemin-Pelletier, 2017). Because the trophoblast represents a cell type that mimics all characteristics of tumor cells, such as migration and invasion into the maternal decidua, one can speculate that the imbalance in the CK2α/CK2β ratio implying an overexpression in CK2α levels might contribute to the deregulation of key developmental processes during placental development, such as migration and invasion and hence, the development of PE early during gestation. This hypothesis could be verified in PE animal models with genetic or idiopathic causes of the disease.

The aberrant increase in CK2 activity in PE placenta could be considered either as a cause or as a consequence of the disease. The second hypothesis is more plausible, since PE is characterized by a decrease in trophoblast migration and invasion. In this setting, an increase in CK2 activity might help in restoring the invasive processes. CK2 was characterized as an anti-stress factor (Watanabe, 2012) and its up-regulation may contribute to overcome the oxidative stress and the hypoxic environment often associated with PE (Schneider, 2009; Watanabe, 2011; Manni., 2012; Tamaru, 2013; Intemann, 2014; Reneke, 2017). Importantly, it is well established that in mammalian systems the adaptive response to hypoxia is accompanied by an increase in the expression of a variety of genes, including glycolytic enzymes and alcohol dehydrogenase enzymes.

Elevated CK2 activity has been uniformly documented in different human cancer types and has been correlated with aggressive tumor behavior (Tawfic, 2001; Faust and Montenarh, 2000). Cancer cells bearing activated CK2 signaling pathways show distinctive features such as growth advantage, enhanced survival, and dynamic adaptation to stress.

Future investigations are needed to determine whether this dysregulation is a cause or consequence of the disease.

In conclusion, the results of this study have demonstrated that placental CK2 plays a critical role during the first trimester of pregnancy and that its expression is deregulated in PE. This is the first report highlighting the role of such a key enzyme in normal and pathological placental development. Dysregulation in CK2 should be ranked among major processes that contribute to altered placental development and fetal outcome. Thus CK2 may be proposed as a new prognostic marker for PE.

Figure legends

Figure 1. CK2α and CK2β protein expression in the human placenta during the first trimester of pregnancy.

Panel A reports representative photographs of chorionic villi collected at 8 (a, d), and 13 (b, e, c and f) weeks of gestation (Wg) and immunostained with anti- CK2α and CK2β antibodies (brown staining). Negative control is illustrated in (g). **Panel B** reports a representative Western blot analysis that compares CK2α and CK2β protein levels in placenta collected during the early (6-9 Wg) and late first trimester of pregnancy (10-13 Wg). **Panel C** reports the quantification of the intensity of the CK2α and CK2β bands in three independent experiments (**p<0.01; ns = not significant; n = 12 early first trimester and n = 12 for late first trimester). Standardization of the protein signals was performed using β-actin. **Panel D** compares CK2α and CK2β mRNA levels in early and late first trimester (**p<0.01; n = 15 for early first trimester and n = 16 for late first trimester).18S, GAPDH and RPL0 RNA were used as internal controls. **Panel E** compares CK2 activity in placental tissue homogenates from early first trimester (n = 9) and late first trimester (n = 6). Cytotrophoblast (Ct), Hobfauer cells (Hb), Extravillous trophoblast (EVT) syncytiotrophoblast (St). Scale bar = 50μm

Figure 2: Role of CK2 in trophoblast proliferation, migration and invasion.

Panel A reports the proliferation of HTR cells using Incucyte device in the absence or presence of CX (4 μM) during 72h. (**p ≤ 0.01; ns = not significant; n = 12). **Panel B** reports the percentages of wound closures of HTR cells in the absence or presence of CX (4 μM) using Incucyte device during 72 h. (**p ≤ 0.01; ns = not significant; n = 10). **Panel C** Shows representative photographs of HTR cells at 24 h of their incubation with or without CX (4 μM), using the Trans well system. **Panel D** reports the quantification of invasion rate of HTR cells in the absence or presence of CX (4 μM), (**p ≤ 0.01; n = 8).

Figure 3: CK2 contributes to extravillous trophoblast invasion in the PEX model.

Panel A reports representative photographs of PEX cultures transfected with Si Scramble or Si CK2α, at t0 (a, b) and 72 hours of culture later (c, d). **Panel B** represents the quantification the larger number of invasive extravillous trophoblast within the matrigel in the Si Scramble (c) condition compared to Si CK2 α (d). (*p≤ 0.05; **p ≤ 0.01; n = 4 in each conditions). **Panel C** reports the effects of CK2α silencing on its mRNA relative to mean of 18S, RPL0 and GAPDH as determined by RT-q PCR (**p ≤ 0.01; n = 4). **Panel D** reports representative photographs of PEX cultures treated or not with CX (4μM), at t0 (a, b) and 72 hours of

culture later (c, d). **Panel E** represents the quantification of the larger number of invasive extravillous trophoblast within the matrigel in the CTL condition (c) compared to the CX condition (d). (*p≤0.05; **p ≤ 0.01n = 7 for CTL and n = 5 for CX 4 μM). **Panel F** shows CK2 enzyme activity in PEX homogenates CTL vs CX 4 μM condition (**p ≤ 0.01; n=7 for CTL and n=5 for CX 4 μM condition).

Figure 4: Comparison of CK2α mRNA and protein expression in normal and preeclamptic placentas.

Panel A compares CK2α and CK2β mRNA levels in PE and CTL placentas (**p <0.01; ns = not significant; n = 18 CTL and n = 10 PE) **Panel B** reports representative Western-blot analysis that compares the expression of CK2α and CK2β in CTL versus PE placental proteins. **Panel C** reports the quantification of the levels of CK2α and CK2β protein expression (**p<0.01; n = 18 CTL and n = 10 PE). **Panel D** reports CK2 activity in CTL versus PE placenta homogenates (**p<0.01, n = 18 CTL and n = 10 PE). **Panel E** reports representative photographs of placental sections collected from CTL (a, c, d, and f) and PE (b, and e) patients and immunostained with an anti-CK2α and anti-CK2β antibodies. Photograph in (c and f) represents a negative control. Scale bar: 50 μm, **Bv**: blood vessel; **ST** = Syncytiotrophoblast.

Figure 5: Comparison of CK2α protein expression and activity in STOX1 overexpressing cells and in STOX1 placentas.

Panel A reports representative blot that compares the expression of CK2α and CK2β in WT versus Stox1 mice placentas. **Panel B** reports the levels of CK2α and CK2β protein expression in WT versus Stox1 mice (*p<0.05, ns = non-significant; n = 6) **Panel C** reports CK2 enzyme activity in WT versus Stox1 mice placental homogenates (**p <0.01; n = 12 for WT and n = 8 for Stox1 mice). **Panel D** reports representative western-blot analysis that compares the expression of CK2α and CK2β in CTL versus Stox1 cells. **Panel E** reports the quantification of the levels of expression of CK2α and CK2β in CTL versus Stox1 cell (*p<0.05, ns = not significant; n = 6). **Panel F** reports CK2 enzyme activity in CTL cell versus Stox1 cell homogenates (**p<0.01; n = 6). Standardization of protein loading was performed using antibodies against β-actin.

Figure S1: CK2α and CK2β protein expression in C57bl/6j placenta during gestation.
Panel A reports a representative blot that compares CK2α and CK2β expression in C57bl6/j placentas collected throughout gestation (10.5, 14.5 and 17.5 dpc). β actin was used to standardize for protein loading.

Panel B reports the quantification of the protein levels of CK2α and CK2β in three independent experiments (**p<0.01; ns = not significant; n = 12 for 10.5 dpc, n = 10 for 14.5 dpc and n = 16 for 17.5 dpc). Values are the mean ± SEM. **Panel C** compares CK2α and CK2β mRNA in C57bl6/j placentas collected throughout gestation (10.5, 14.5 and 17.5 dpc), (**p<0.01; ns = not significant; n = 12 for 10.5 dpc, n = 12 for 14.5 dpc and n = 16 for 17.5 dpc). GAPDH and RPL13a RNA were used as internal control for mRNA standardization.

Figure S2: Validation of the CX inhibitory effect of the activity of CK2 in HTR8SV/neo cells and PEX culture.

Panel A reports CK2 activity in HTR treated or not with 2, 4, 5 and 10 µM of CX (**p<0.01; ns = not significant; n = 4). **Panels B** reports effect of CX on cell death using the IncuCyte ZOOM system. The ratio of red fluorescent (PI-positive) to total cell confluence was plotted over the time of treatment (**p<0.01; ns = not significant; n = 4). **Panels C** reports representative blot that compares the effect of CX on the expression of CK2α, CK2β and on the phosphorylation of Akt protein in HTR CTL and HTR treated cells with 2 and 4 µM of CX (n = 4). **Panel D** reports representative blot that compares the levels protein expression of CK2α, CK2β and the phosphorylation of Akt protein in PEX CTL and PEX treated with 2 and 4 µM of CX (n = 4). Standardization of protein signals was performed using antibodies against β-actin.

Acknowledgements

We acknowledge the following sources of fundings: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (U1036), University Grenoble-Alpes, Commissariat à l'Energie Atomique (DSV/BIG/BCI), Région Auvergne-Rhône-Alpes "CLARA", Ligue Nationale contre le Cancer and Ligue Départementale (Isère) and Fondation pour la recherche Médicale (FRM) SPF20150934074. We also thank Ms Sophie Ndagijimana for her technical assistance.

Author contributions

The work presented in this paper is the result of the contribution of 9 members.

RAN: designed the experiments , data collection, data analysis generation of figures and writing of the paper; **DR:** performed experiment in relation to HTR cells migration, invasion and proliferation; **SL:** performed WB ,qPCR and cell culture; **CR:** performed immunohistochemistry and qPCR; **DV**: provided the French cohort of PE samples, SOTX1 mice and cells; **MB:** contributed to the design of the experiments and contributed to the writing; **CC**: performed CK2 enzymatic activity test and contributed to the design and to the scientific discussions; **OF** and **NA**: designed the experiments, supervised the work and contributed to the writing.

All authors were involved in writing the paper and had final approval of the submitted

Figure 1

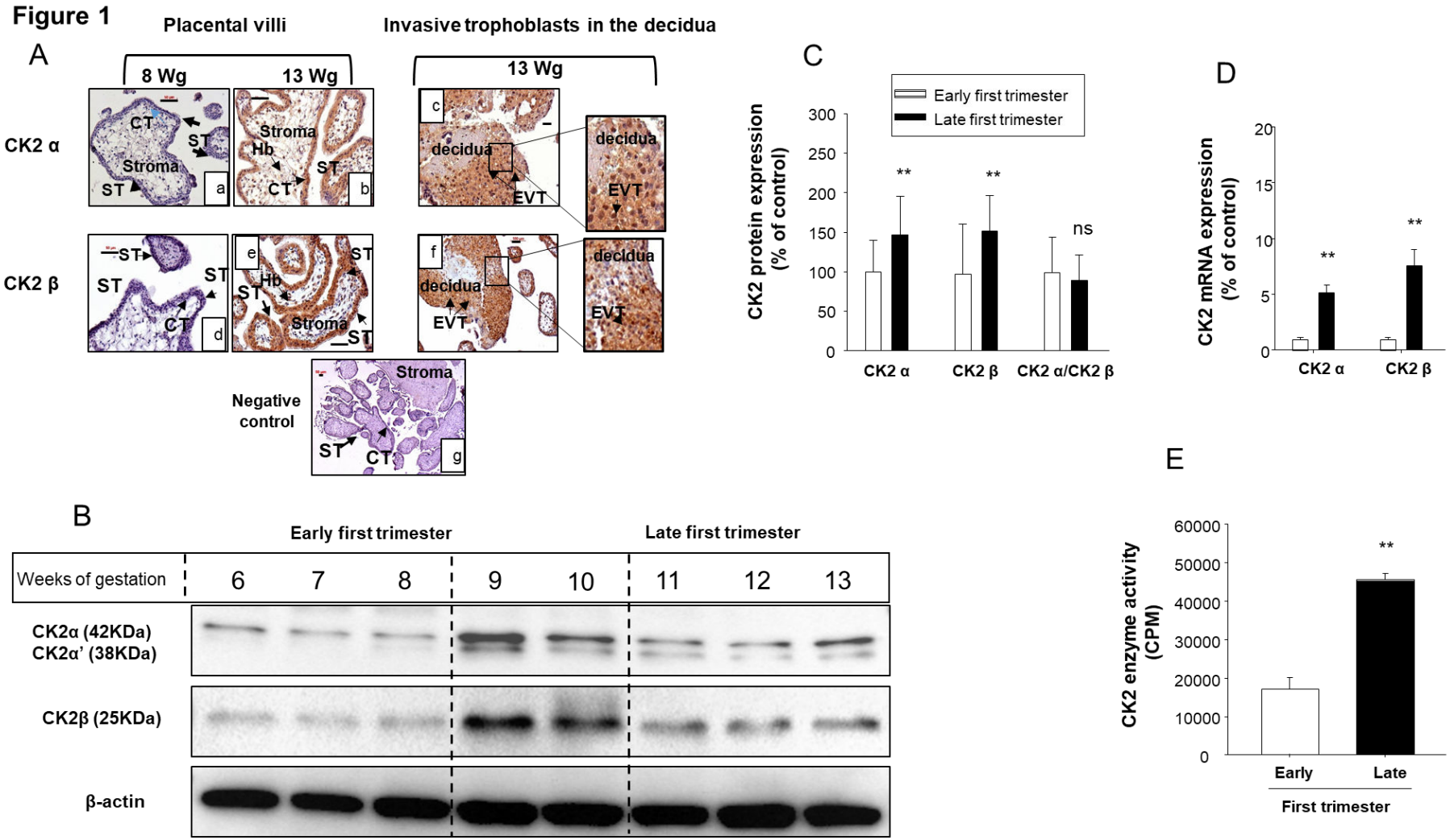

A
Placental villi
Invasive trophoblasts in the decidua
8 Wg
13 Wg
13 Wg
CK2 α
CK2 β
CT
ST
Stroma
Hb
decidua
EVT
a
b
c
d
e
f
g
Negative control
B
Early first trimester
Late first trimester
Weeks of gestation
6
7
8
9
10
11
12
13
CK2α (42KDa)
CK2α' (38KDa)
CK2β (25KDa)
β-actin
C
Early first trimester
Late first trimester
CK2 protein expression (% of control)
300
250
200
150
100
50
0
**
**
ns
CK2 α
CK2 β
CK2 α/CK2 β
D
CK2 mRNA expression (% of control)
20
15
10
5
0
**
**
CK2 α
CK2 β
E
CK2 enzyme activity (CPM)
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
**
Early
Late
First trimester

Figure 2

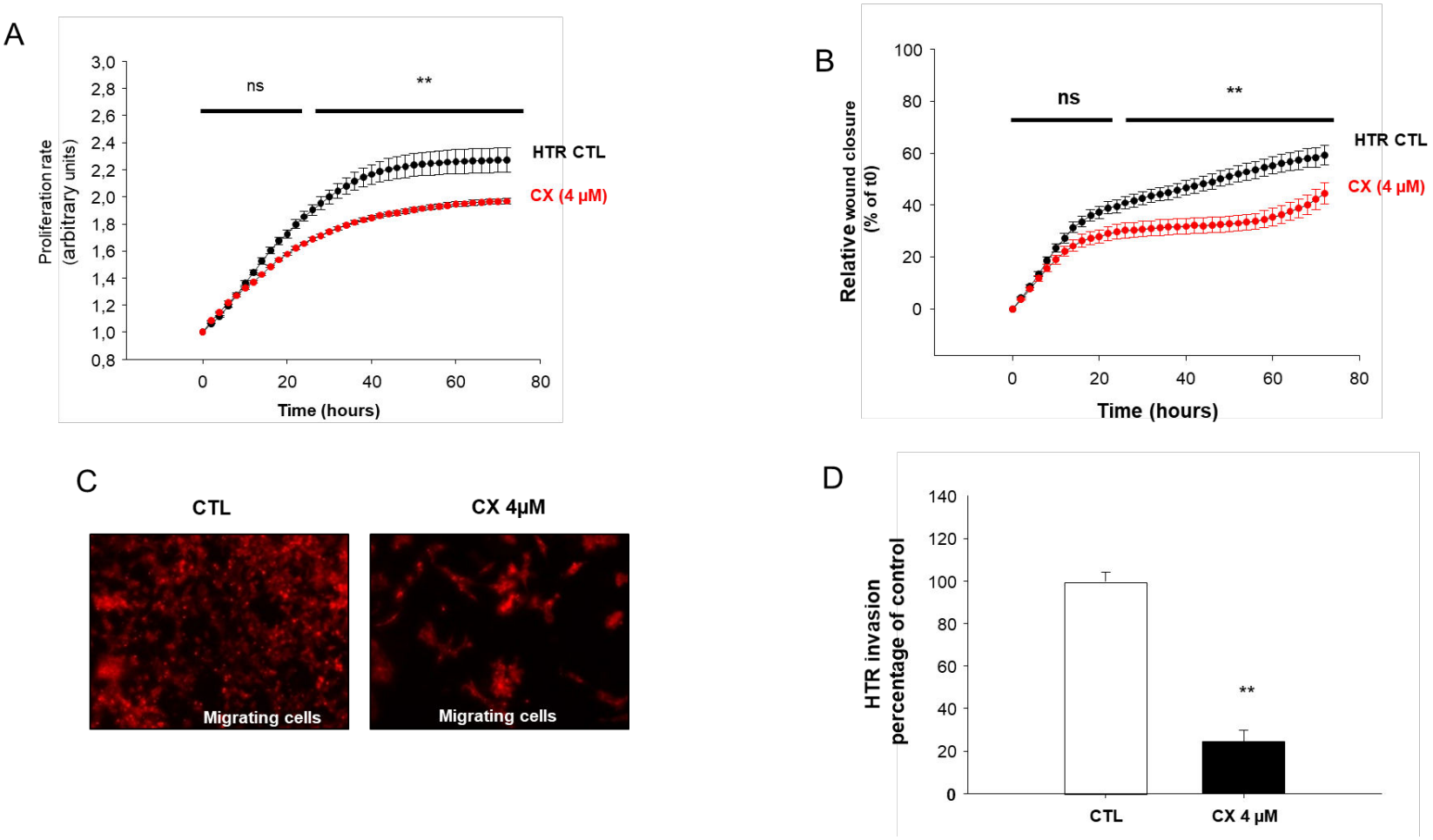

A
Proliferation rate (arbitrary units)
3,0
2,8
2,6
2,4
2,2
2,0
1,8
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
ns
**
HTR CTL
CX (4 µM)
0
20
40
60
80
Time (hours)
B
Relative wound closure (% of t0)
100
80
60
40
20
0
ns
**
HTR CTL
CX (4 µM)
0
20
40
60
80
Time (hours)
C
CTL
CX 4µM
Migrating cells
Migrating cells
D
HTR invasion percentage of control
140
120
100
80
60
40
20
0
**
CTL
CX 4 µM

Figure 3

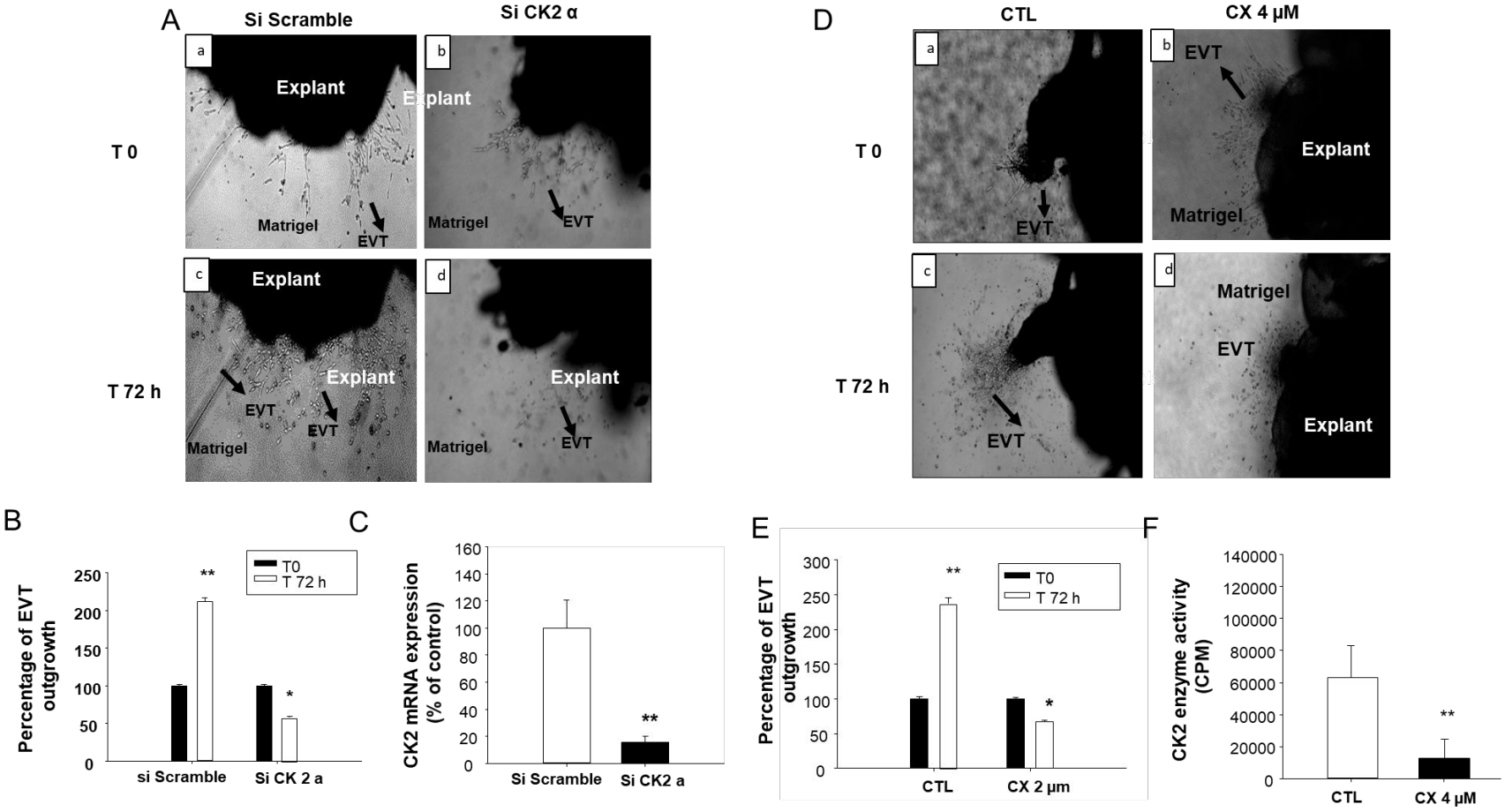

A
Si Scramble
Si CK2 α
T 0
T 72 h
a
b
c
d
Explant
Matrigel
EVT
D
CTL
CX 4 µM
B
Percentage of EVT outgrowth
T0
T 72 h
si Scramble
Si CK 2 a
C
CK2 mRNA expression (% of control)
Si Scramble
Si CK2 a
E
Percentage of EVT outgrowth
CTL
CX 2 µm
F
CK2 enzyme activity (CPM)
CTL
CX 4 µM

Figure 4

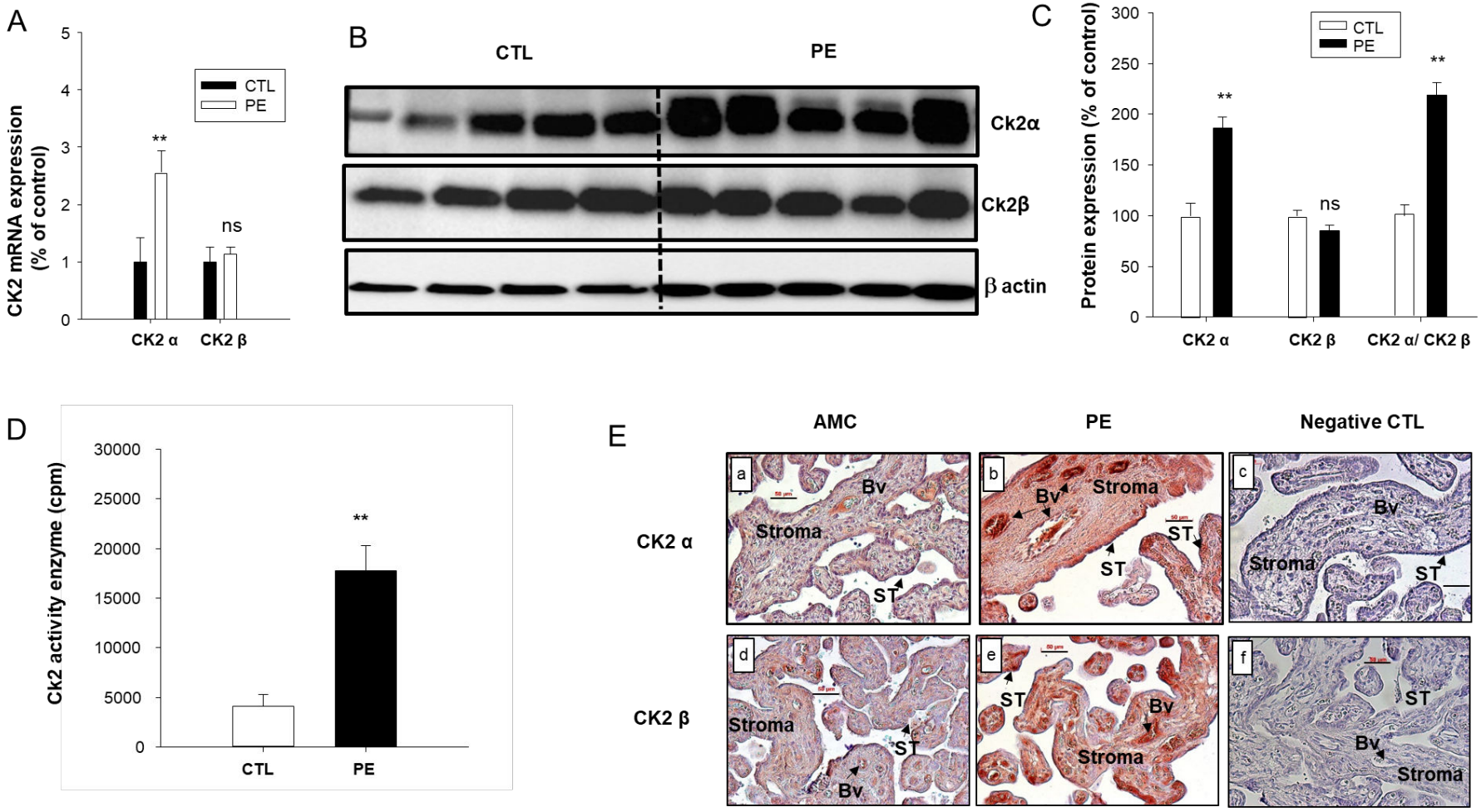

A
CK2 mRNA expression (% of control)
CTL
PE
**
ns
CK2 α
CK2 β
B
CTL
PE
Ck2α
Ck2β
β actin
C
Protein expression (% of control)
CTL
PE
**
ns
**
CK2 α
CK2 β
CK2 α/ CK2 β
D
Ck2 activity enzyme (cpm)
**
CTL
PE
E
AMC
PE
Negative CTL
CK2 α
CK2 β
Bv
Stroma
ST

Figure 5

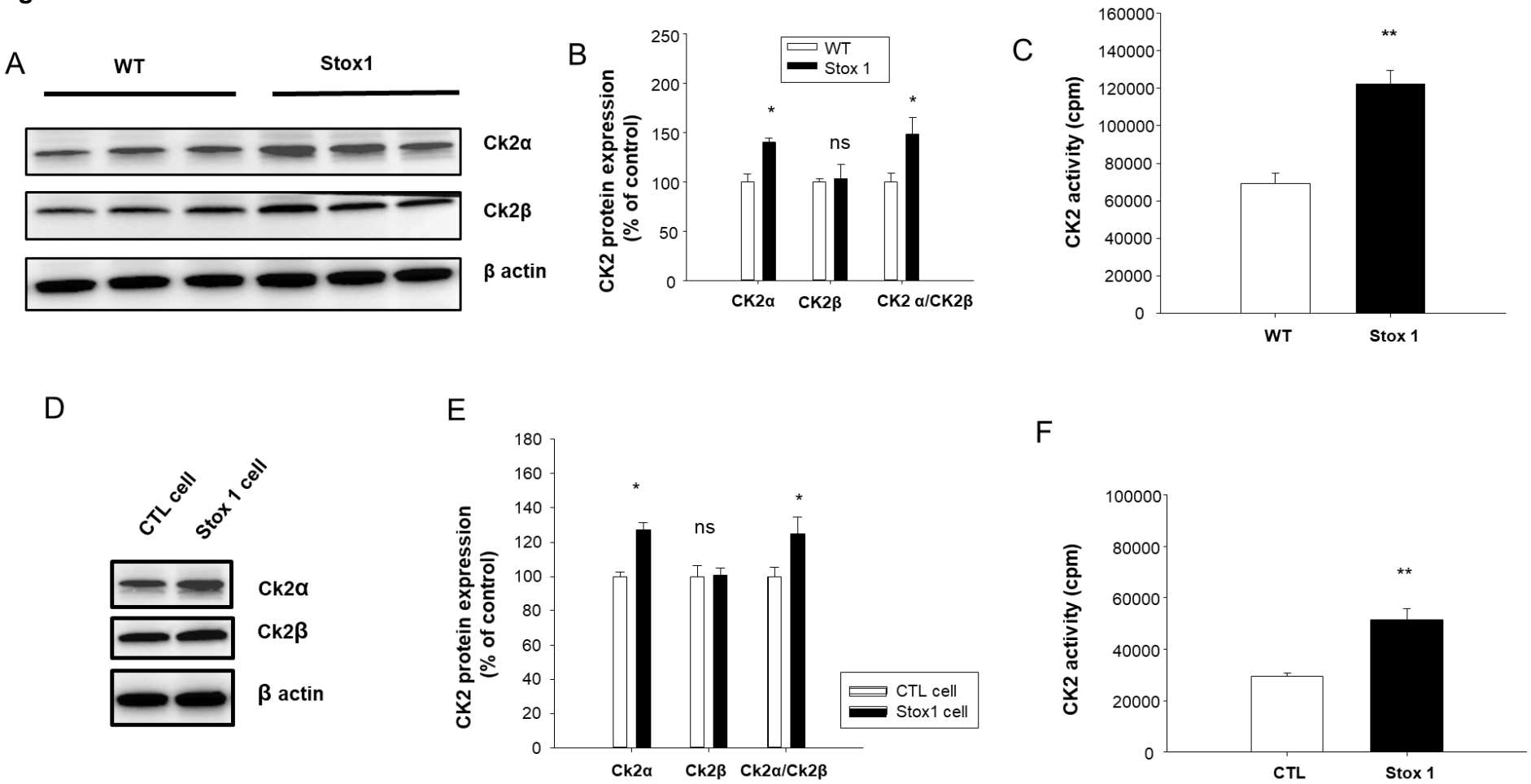
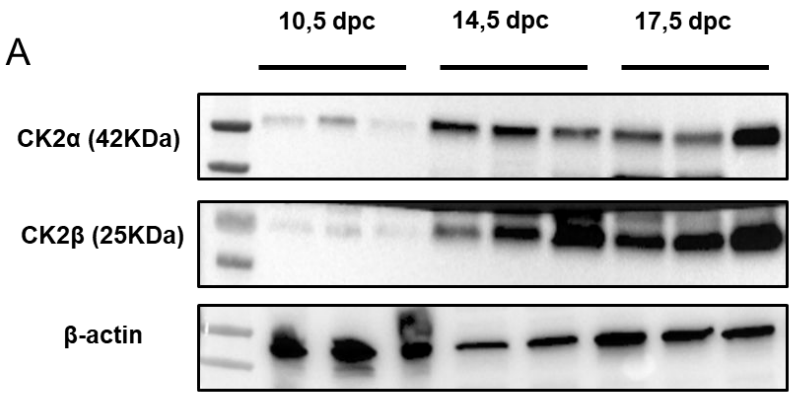
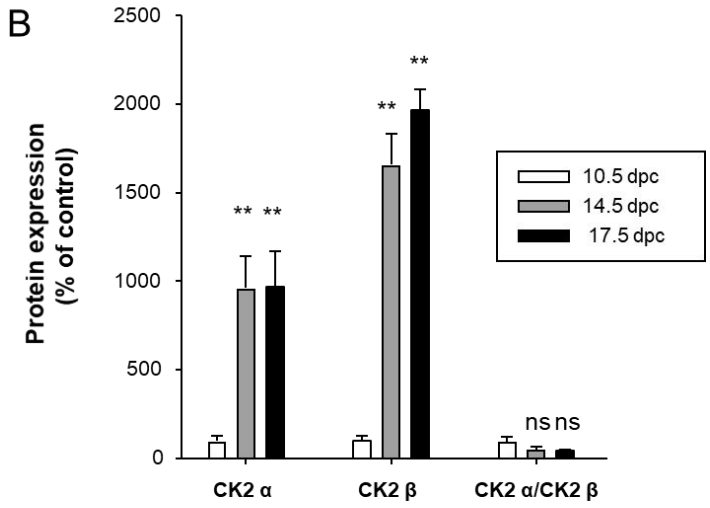

A
WT
Stox1
Ck2α
Ck2β
β actin
B
WT
Stox 1
CK2 protein expression (% of control)
250
200
150
100
50
0
*
ns
*
CK2α
CK2β
CK2 α/CK2β
C
CK2 activity (cpm)
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
**
WT
Stox 1
D
CTL cell
Stox 1 cell
Ck2α
Ck2β
β actin
E
CK2 protein expression (% of control)
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
*
ns
*
CTL cell
Stox1 cell
Ck2α
Ck2β
Ck2α/Ck2β
F
CK2 activity (cpm)
100000
80000
60000
40000
20000
0
**
CTL
Stox 1

Table 1

Species	Genes	Oligos	
		Forward	Reverse
Human	*αCK2*	TGTCCGAGTTGCTTCCCGATACTT	TTGCCAGCATACAACCCAAACTCC
	α'CK2	AGCCCACCACCGTATATCAAACCT	ATGCTTTCTGGGTCGGGAAGAAGT
	βCK2	TTGGACCTGGAGCCTGATGAAGAA	TAGCGGGCGTGGATCAATCCATAA
	18S	AAACGGCTACCACATCCAAG	CCTCCAATGGATCCTCGTTA
	RPL0	TCGACAATGGCAGCATCTAC	ATCCGTCTCCACAGACAAGG
	GAPDH	ACCCAGAAGACTGTGGATGG	TTCTAGACGGCAGGTCAGGT
Mouse	*αCK2*	AGGATAGCCAAGGTTCTGGGA	CCATCGCTTACGGGAGTGTC
	α'CK2	TCCCGAGCTGGGGTAATCAA	TGTTCCACCACGAAGGTTCTC
	βCK2	AGGCATCGCACAAATGTTGG	ACTTGGGGCAGTAGAGTTTCACC
	RPL13a	CCCTTCCACCCTATGACAAGA	TTCTCCTCCAGAGTGGCTGT
	GAPDH	AACGACCCCTTCATTGAC	TCC ACG ACA TAC TCA GCA

Figure S1


A
10,5 dpc
14,5 dpc
17,5 dpc
CK2α (42KDa)
CK2β (25KDa)
β-actin


B
Protein expression
(% of control)
2500
2000
1500
1000
500
0
10.5 dpc
14.5 dpc
17.5 dpc
** **
**
**
ns ns
CK2 α
CK2 β
CK2 α/CK2 β

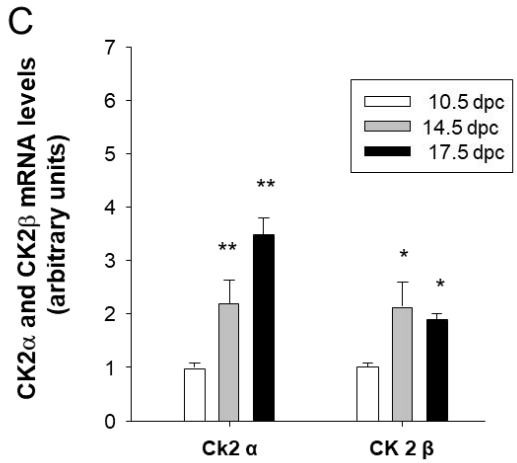
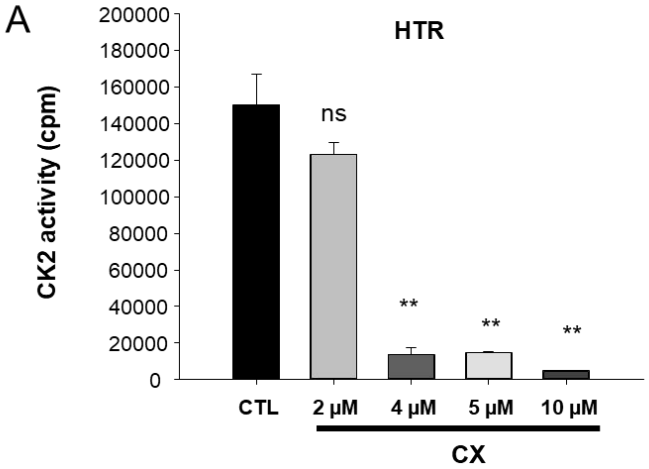
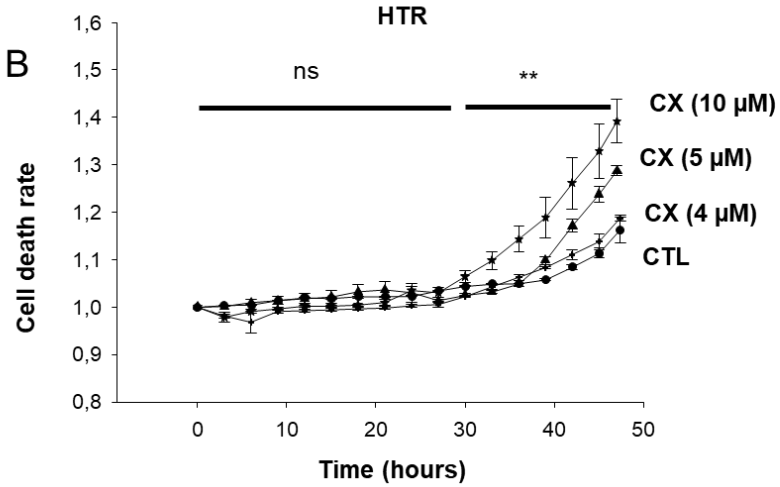
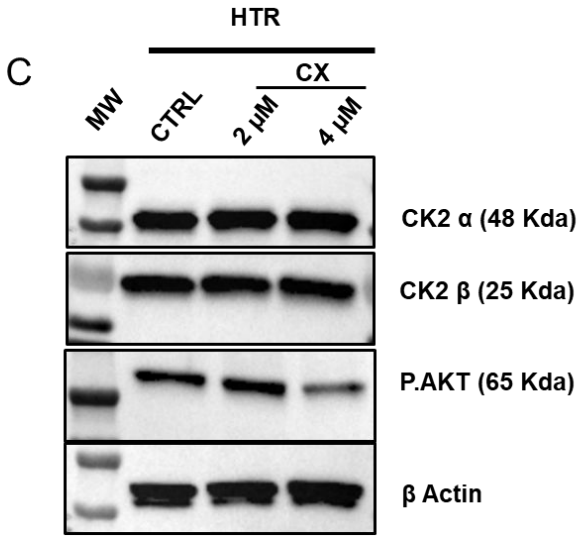
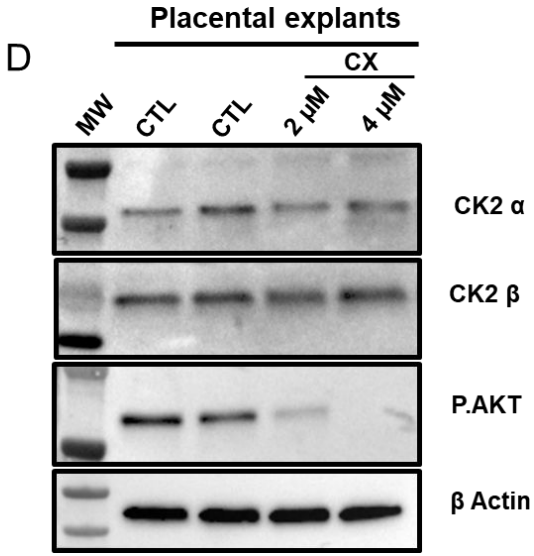

C
CK2α and CK2β mRNA levels
(arbitrary units)
7
6
5
4
3
2
1
0
10.5 dpc
14.5 dpc
17.5 dpc
**
**
*
*
Ck2 α
CK 2 β

Figure S2


A
HTR
CK2 activity (cpm)
200000
180000
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
ns
**
**
**
CTL
2 µM
4 µM
5 µM
10 µM
CX


B
HTR
Cell death rate
1,6
1,5
1,4
1,3
1,2
1,1
1,0
0,9
0,8
ns
**
CX (10 µM)
CX (5 µM)
CX (4 µM)
CTL
0
10
20
30
40
50
Time (hours)


C
HTR
CX
MW
CTRL
2 µM
4 µM
CK2 α (48 Kda)
CK2 β (25 Kda)
P.AKT (65 Kda)
β Actin


D
Placental explants
CX
MW
CTL
CTL
2 µM
4 µM
CK2 α
CK2 β
P.AKT
β Actin

Résumé du projet

Résumé

Les môles hydatiformes complètes (MHC) sont des lésions bénignes précancéreuses du placenta qui dans 5 % des cas évoluent vers un cancer très prolifératif dénommé « choriocarcinome » (CC).

Différents travaux ont rapporté une corrélation entre le développement des MHC récurrentes et les mutations du gène *NLRP7*. Ce gène code pour la protéine NLRP7 de l'inflammasome dont l'activation contribue à la production d'IL-1β et IL-18. La majorité des travaux publiés à ce jour sont axés sur l'étude des mutations de *NLRP7*. En revanche, aucune étude n'a caractérisé son rôle dans les placentations normale et tumorale.

L'objectif de mon projet de thèse était de caractériser le rôle de cette protéine dans les placentas normal et tumoral. Trois approches ont été utilisées, *i*) Clinique, en collaboration avec le CHU de Casablanca ; le centre de référence Français des Maladies Gestationnelles Trophoblastiques (MGT) et l'Université Mc Gill pour l'accès aux tissus et sera collectés chez des patientes MHC ou CC; *ii*) *In Vitro*/*Ex Vivo*, pour la caractérisation du rôle du NLRP7 dans les processus clés des développements placentaires normal et tumoral dans des systèmes de cultures en 2D et 3D. Deux lignées trophoblastiques ont été utilisées : les cellules non tumorales HTR-8 Sv/Neo et la lignée JEG3 issue d'un CC humain ; *iii*) *In Vivo*, par l'injection orthotopique de cellules JEG3, invalidées ou non pour l'expression du gène *NLRP7* (stratégie ShRNA), dans le placenta de souris gestantes. L'impact tumoral des JEG3 suite à leur injection dans la corne utérine et dans la veine de la queue de souris non gestantes a également été étudié.

Mes travaux ont démontré que la protéine NLRP7 est abondamment exprimée dans le placenta normal au cours du premier trimestre de la grossesse, que son expression est régulée positivement par l'hypoxie, paramètre clé du développement du placenta et que cette protéine contrôle les processus clés du développement placentaire comme la prolifération et la différentiation trophoblastique.

Par ailleurs, j'ai aussi démontré que NLRP7 joue un rôle compensatoire important dans la pathologie du retard de croissance intra-utérin. En relation avec le développement tumoral placentaire, mes travaux ont démontré que, *i)* la protéine NLRP7 est augmentée dans le placenta de patientes MHC et CC, et que les protéines de la machinerie des inflammasomes sont aussi dérégulées, *ii)* les cellules tumorales JEG3 surexpriment le NLRP7 comparé au HTR-8 Sv/Neo, *iii)* l'invalidation de NLRP7 dans les JEG3 induit une baisse de leur prolifération et l'augmentation de leur migration ainsi que l'invasion dans les systèmes de culture 2D et 3D. L'étude *in vivo* a démontré que l'invalidation de NLRP7 diminue le développement et la métastase du CC humain dans les trois modèles étudiés.

Les analyses immunohistologiques, RNAseq et anticorps-array ont permis la caractérisation des mécanismes régulés par la protéine NLRP7 dans les JEG3. L'ensemble de mes travaux ont mis en évidence le rôle critique de la protéine NLRP7 dans les développements placentaires normal et tumoral et propose la machinerie NLRP7 comme cible potentielle pour le traitement du CC.

Abstract

Complete hydatidiform moles (CHM) are benign precancerous lesions of the placenta that evolve in 5 % of cases into a highly proliferative cancer called choriocarcinoma (CC). Numerous studies have reported correlations between the development of recurrent CHM and mutations in the *NLRP7* gene. NLRP7 protein belongs to the NLRP7-inflammasome, whose activation contributes to the production of mature IL-1β and IL-18. Most of the work published on NLRP7 was focused on the study of *NLRP7* mutations in CHM. Though, no study has characterized its role in normal and tumor placental development. The aim of my thesis project was to characterize the role of this protein in the normal and tumor placenta. Three approaches were used, *i)* A clinical approach, in collaboration with Casablanca University Hospital; the French reference center of Trophoblastic Gestational Disease and with McGill University. These collaborations allowed for tissue access from MHC and CC patients; *ii)* An *in Vitro / Ex Vivo* approach for the characterization of the role of NLRP7 in key processes of normal and tumor placental development using 2D and 3D culture systems. Two trophoblastic cell types were used, a non-tumor cell line, the HTR-8 Sv/Neo and the JEG3 cells, derived from human CC; *iii)* An *In Vivo* approach through orthotopic injection of JEG3 cells, invalidated or not for the expression of the *NLRP7* gene (ShRNA strategy), in the placenta of gravid mice. The tumor impact of JEG3 following their injection into the uterine horn and the vein of the tail of non-pregnant mice was also examined.

The first part of my work showed that NLRP7 protein is abundantly expressed in the normal placenta during the first trimester of pregnancy, that its expression is upregulated by hypoxia, a key parameter in placental development, and that this protein controls key processes of placental development such as proliferation and differentiation. Importantly, I have also demonstrated that NLRP7 plays an important compensatory role in the pathology of intrauterine growth retardation. The second part of my work concerning the role of NLRP7 protein in the placental tumor development demonstrated that *i)* NLRP7 protein levels are increased in the placenta of MHC and CC patients, and that components of the inflammasome machinery are also deregulated, *ii)* the JEG3 cells overexpress NLRP7 compared to HTR-8 Sv/Neo, *iii)* NLRP7 knock-down in JEG3 induced a significant decrease in their proliferation and an increase in their migration and invasion both in the 2D and 3D culture systems. The *in vivo* study demonstrated that the knock-down of NLRP7 decreased the development and metastasis of human CC in the three tested routes. Immunohistological, RNAseq and antibody-array analyses allowed the characterization of the pathways regulated by the NLRP7 protein in JEG3 cells.

Altogether my PhD project characterized the critical role of the NLRP7 protein in normal and tumor placental development and proposes the NLRP7 machinery as a potential target for CC treatment.

Résumé

Les môles hydatiformes complètes (MHC) sont des lésions bénignes précancéreuses du placenta qui dans 5 % des cas évoluent vers un cancer très prolifératif dénommé « choriocarcinome » (CC). Différents travaux ont rapporté une corrélation entre le développement des MHC récurrentes et les mutations du gène *NLRP7*. Ce gène code pour la protéine NLRP7 de l'inflammasome dont l'activation contribue à la production d'IL-1β et IL-18. La majorité des travaux publiés à ce jour sont axés sur l'étude des mutations de *NLRP7*. En revanche, aucune étude n'a caractérisé son rôle dans les placentations normale et tumorale. L'objectif de mon projet de thèse était de caractériser le rôle de cette protéine dans les placentas normal et tumoral. Trois approches ont été utilisées, *i*) Clinique, en collaboration avec le CHU de Casablanca ; le centre de référence Français des Maladies Gestationnelles Trophoblastiques (MGT) et l'Université Mc Gill pour l'accès aux tissus et sera collectés chez des patientes MHC ou CC; *ii*) *In Vitro*/*Ex Vivo*, pour la caractérisation du rôle du NLRP7 dans les processus clés des développements placentaires normal et tumoral dans des systèmes de cultures en 2D et 3D. Deux lignées trophoblastiques ont été utilisées : les cellules non tumorales HTR-8 Sv/Neo et la lignée JEG3 issue d'un CC humain ; *iii*) *In Vivo*, par l'injection orthotopique de cellules JEG3, invalidées ou non pour l'expression du gène *NLRP7* (stratégie ShRNA), dans le placenta de souris gestantes. L'impact tumoral des JEG3 suite à leur injection dans la corne utérine et dans la veine de la queue de souris non gestantes a également été étudié. Mes travaux ont démontré que la protéine NLRP7 est abondamment exprimée dans le placenta normal au cours du premier trimestre de la grossesse, que son expression est régulée positivement par l'hypoxie, paramètre clé du développement du placenta et que cette protéine contrôle les processus clés du développement placentaire comme la prolifération et la différentiation trophoblastique. Par ailleurs, j'ai aussi démontré que NLRP7 joue un rôle compensatoire important dans la pathologie du retard de croissance intra-utérin. En relation avec le développement tumoral placentaire, mes travaux ont démontré que, *i)* la protéine NLRP7 est augmentée dans le placenta de patientes MHC et CC, et que les protéines de la machinerie des inflammasomes sont aussi dérégulées, *ii)* les cellules tumorales JEG3 surexpriment le NLRP7 comparé au HTR-8 Sv/Neo, *iii)* l'invalidation de NLRP7 dans les JEG3 induit une baisse de leur prolifération et l'augmentation de leur migration ainsi que l'invasion dans les systèmes de culture 2D et 3D. L'étude *in vivo* a démontré que l'invalidation de NLRP7 diminue le développement et la métastase du CC humain dans les trois modèles étudiés. Les analyses immunohistologiques, RNAseq et anticorps-array ont permis la caractérisation des mécanismes régulés par la protéine NLRP7 dans les JEG3. L'ensemble de mes travaux a mis en évidence le rôle critique de la protéine NLRP7 dans les développements placentaires normal et tumoral et propose la machinerie NLRP7 comme cible potentielle pour le traitement du CC.

Abstract

Complete hydatidiform moles (CHM) are benign precancerous lesions of the placenta that evolve in 5 % of cases into a highly proliferative cancer called choriocarcinoma (CC). Numerous studies have reported correlations between the development of recurrent CHM and mutations in the *NLRP7* gene. NLRP7 protein belongs to the NLRP7-inflammasome, whose activation contributes to the production of mature IL-1β and IL-18. Most of the work published on NLRP7 was focused on the study of *NLRP7* mutations in CHM. Though, no study has characterized its role in normal and tumor placental development. The aim of my thesis project was to characterize the role of this protein in the normal and tumor placenta. Three approaches were used, *i)* A clinical approach, in collaboration with Casablanca University Hospital; the French reference center of Trophoblastic Gestational Disease and with McGill University. These collaborations allowed for tissue access from MHC and CC patients; *ii)* An *in Vitro / Ex Vivo* approach for the characterization of the role of NLRP7 in key processes of normal and tumor placental development using 2D and 3D culture systems. Two trophoblastic cell types were used, a non-tumor cell line, the HTR-8 Sv/Neo and the JEG3 cells, derived from human CC; *iii)* An *In Vivo* approach through orthotopic injection of JEG3 cells, invalidated or not for the expression of the *NLRP7* gene (ShRNA strategy), in the placenta of gravid mice. The tumor impact of JEG3 following their injection into the uterine horn and the vein of the tail of non-pregnant mice was also examined. The first part of my work showed that NLRP7 protein is abundantly expressed in the normal placenta during the first trimester of pregnancy, that its expression is upregulated by hypoxia, a key parameter in placental development, and that this protein controls key processes of placental development such as proliferation and differentiation. Importantly, I have also demonstrated that NLRP7 plays an important compensatory role in the pathology of intrauterine growth retardation. The second part of my work concerning the role of NLRP7 protein in the placental tumor development demonstrated that *i)* NLRP7 protein levels are increased in the placenta of MHC and CC patients, and that components of the inflammasome machinery are also deregulated, *ii)* the JEG3 cells overexpress NLRP7 compared to HTR-8 Sv/Neo, *iii)* NLRP7 knock-down in JEG3 induced a significant decrease in their proliferation and an increase in their migration and invasion both in the 2D and 3D culture systems. The *in vivo* study demonstrated that the knock-down of NLRP7 decreased the development and metastasis of human CC in the three tested routes. Immunohistological, RNAseq and antibody-array analyses allowed the characterization of the pathways regulated by the NLRP7 protein in JEG3 cells. Altogether my PhD project characterized the critical role of the NLRP7 protein in normal and tumor placental development and proposes the NLRP7 machinery as a potential target for CC treatment.