



HAL
open science

Le syndrome d'alcoolisme placentaire : impact fonctionnel de l'alcoolisation in utero

Jessica Dalmasso

► **To cite this version:**

Jessica Dalmasso. Le syndrome d'alcoolisme placentaire : impact fonctionnel de l'alcoolisation in utero. Embryologie et organogenèse. Université Paris Cité, 2022. Français. NNT : 2022UNIP5046 . tel-04259882

HAL Id: tel-04259882

<https://theses.hal.science/tel-04259882v1>

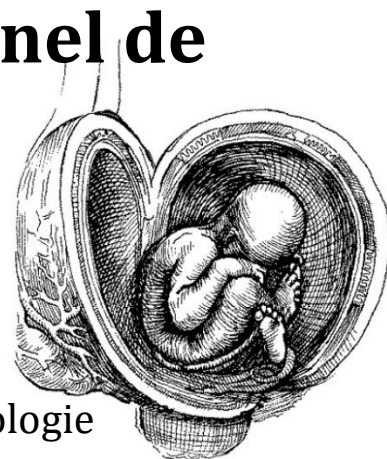
Submitted on 26 Oct 2023

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.

Université Paris Cité
Ecole doctorale Bio SPC ED562
Laboratoire UMR-S 1139 3PHM

Le Syndrome d'Alcoolisme Placentaire : impact fonctionnel de l'alcoolisation *in utero*



Par Jessica DALMASSO

Thèse de doctorat de Physiologie et Physiopathologie
Dirigée par le Professeur Sophie GIL

Présentée et soutenue publiquement le 06.07.2022

Devant un jury composé de

NOMS PRENOMS	QUALITE	ETABLISSEMENT ou TUTELLE UNIVERSITAIRE
Le Rapporteur, Mme DIEUDONNE Marie Noelle	Professeure des Universités	Université Versailles Saint Quentin en Yveline UMR-1198 INRAE-UVSQ
Le Rapporteur, M. SAPIN Vincent	Professeur des Universités	Université de Clermont Ferrand UMR UCA CNRS 6293 INSERM 1103
L'examineur, M. GUIBOURDENCHE Jean	Professeur des Université- Praticien Hospitalier	Université Paris Cité INSERM U1139 CHU Cochin, AP-HP
L'examineur, M. GONZALEZ Bruno	Directeur de Recherche INSERM	Université de Rouen Normandie INSERM UMR 1245
La Directrice de thèse, Mme GIL Sophie	Professeure des Universités	Université Paris Cité INSERM UMR 1139
Membre Invité d'honneur Mme BETMALLE Cécile	Sage-femme	Maternité de Port-Royal CHU Cochin AP-HP

Remerciements

Chère famille, chère.s ami.e.s, chère.s collègues & Mesdames, Messieurs les membres du jury,

3ans, 217 jours et 5 heures se sont écoulés depuis le début de ma thèse. C'est avec un immense plaisir que je m'apprête à vous présenter mes travaux de recherche. Avant d'entrer dans le vif du sujet, quelques remerciements me tiennent à cœur.

Je remercie chaleureusement les membres du jury, Madame la Professeure Marie-Noelle Dieudonné, Monsieur le Professeur Hospitalo-Universitaire Vincent Sapin, Madame la Professeure Sophie Gil, Monsieur le Professeur Hospitalo-Universitaire Jean Guibourdenche, Monsieur de Directeur de Recherche Bruno Gonzalez et Madame la Sage-femme addictologue Cécile Betmalle. C'est un honneur pour moi de soumettre mon travail à votre expertise. Merci à chacun d'entre vous d'avoir accepté d'être membre de mon jury et surtout merci à chacun de vous d'avoir été une pierre à l'édifice à un moment de ma thèse. Vous le savez, cela me tenait particulièrement à cœur que ce soit vous, spécifiquement, qui soyez présents pour mettre le point final à ces 3ans et demi de doctorat.

Je remercie tout particulièrement ma directrice de thèse, la professeure Sophie Gil, pour son soutien sans faille, sa confiance en moi, sa compréhension et surtout la foi qu'elle a placée en moi. Sophie tu le sais, je ne me serais pas vu faire mon doctorat avec quelqu'un d'autre, merci d'avoir accepté de m'embarquer dans ce grand projet qui, je l'espère contribuera à faire avancer la recherche sur l'exposition à l'alcool fœtal et aura de belles perspectives. Je te remercie sincèrement de m'avoir donné l'opportunité de vivre cette expérience incroyable qu'est le doctorat, sur un sujet qui me tenait particulièrement à cœur et de me pousser vers mes projets d'avenir. C'est un immense honneur pour moi d'avoir été ta thésarde.

Je remercie bien sûr toute l'équipe de l'UMR-S 1139, ce fût très enrichissant de travailler à vos côtés et merci au docteur Fournier de m'avoir accueillie au sein de l'équipe et à Madame la professeure Ioana Ferecatu de m'avoir accueillie en stage en 2015 et ainsi donné l'opportunité d'intégrer l'unité pour les 7 années qui ont suivies.

A mon bocal Angiogenine, Madame la docteure Josette Badet, notre puit de savoir, mon amie & Madame la docteure Giovanna Vinci, mon italienne préférée, merci de m'avoir accueillie dans votre espace, de m'avoir écouté me plaindre et d'avoir toujours fait preuve

de bienveillance envers moi. Merci de votre patience et merci pour tout ce temps passé ensemble, j'espère que vous savez toute l'affection que j'ai pour vous deux. Je vous souhaite de toujours être passionnées et j'espère avoir de vos nouvelles par la suite.

Madame la future docteure Gaelle Deval, Codoc du love, je suis si heureuse que toi et tes princes de Lu non bio soient entrés dans notre bureau. Je te remercie d'avoir accepté de rejoindre notre bocal et de t'être adaptée à nos petites habitudes ! Evidemment je ne pourrais écrire ici tout l'amour que j'ai pour toi, qui s'étend bien au-delà du laboratoire et qui je l'espère perdurera toujours dans le temps. Nos chorées endiablées sur Vaïana en pièce de culture, nos goûters muesli aux céréales du sheit*n, nos fous-rires, nos moments de doutes et de colère, nos pauses au soleil, nos confidences, nos petits post-it de l'amour et notre emploi du temps partagé me manque déjà. Love U codoc et sache que je ne t'abandonne pas, tu pourras compter sur moi pour avoir foi en toi pendant la rédaction.

A mes co-doctorantes, Madame la docteure Margaux Nedder, Madame la docteure Camille Fraichard, Madame la future docteure Louise Fliedel, merci d'avoir rendue ma vie bien plus chouette ! Particulièrement à Camille de s'être livrée à moi dans un moment où, nous en avons toutes les deux besoin, et de m'avoir permise de prendre du recul. Je vous souhaite à chacune d'entre vous le meilleur pour la suite.

A mes amies, Madame Jasmina Rogozarski & Madame Audrey Chissey, je vous remercie de m'avoir supportée pendant 7 ans et d'avoir toujours été là dans les bons et les mauvais jours. Audrey, je ne te remercierais jamais assez pour la patience infiiiiiiiiie dont tu as fait preuve envers moi lors de la mise au point des manip d'immuno. Je sais que je n'ai pas toujours été la plus sage des doctorantes pour la responsable Hygiène et Sécurité que tu es, mais sache que j'ai bien éduquée Gaelle pour ne pas trop te torturer...! Ma Jasminouille, ma serbe d'amour, ton accent me manque déjà, je pense t'enregistrer pour mon réveil matin (ça me ferait sûrement sortir plus vite du lit !). Merci pour tous ces moments partagés, pour toute la patience, l'amour maternel que tu as souvent eu pour moi & vite fait merci pour les kilos que tu m'as fait prendre avec tes brownies !! Merci à vous deux pour les rires et les meilleures pauses déj au soleil !

A notre équipe, Madame la super gynécologue, la docteure Anne Gaelle Cordier, Madame Françoise Vibert et Madame Christelle Simasotchi, merci mille fois pour absolument tout ce que vous avez fait pour moi. Françoise, évidemment, comment ne pas

te remercier, tu m'as appris à techniquer, à avoir confiance en moi et à customiser mes manip. Tu m'as appris à me poser les bonnes questions. Tu m'as énormément manqué sur la fin de ma thèse mais je suis tellement heureuse que tu profites à fond enfin de tout ce temps qui te manquait auprès de ta famille. Merci de ta patience, ta bonne humeur constante, des « astuces de Françoise », et pour chacun des moments passés ensemble. Christelle, merci de m'avoir appris la perfusion, d'avoir su m'écouter et d'avoir toujours été juste avec moi. Anne Gaelle, un merci qui vient du plus profond de mon cœur de m'avoir permis de faire un pas de géant vers mon rêve d'enfant. Merci d'avoir eu confiance en moi, de m'avoir permise de faire ce stage incroyable à Bécclère et de m'avoir accueillie avec toi sur des opérations pendant lesquelles j'ai failli tourner de l'œil.

A mes amis du service de la faculté, merci d'avoir pris soin de moi pendant ces trois années, d'avoir toujours eu un mot gentil, d'être toujours souriants. J'ai été extrêmement touchée par vos petits appels PTI chaque fois que j'ai fait une nuit blanche au labo, pour savoir si j'allais bien et si tout s'était bien passé avant de rentrer chez vous. Cette faculté a beaucoup de chance de vous avoir et moi j'ai eu beaucoup de chance d'être entourée de tant de bienveillance de votre part pendant toutes ces années.

A ma famille, mon frère, ma belle-sœur, ma grand-mère, mes tantes, mes oncles, mes cousines, ma meilleure amie, ma famille de cœur, merci d'avoir toujours pris le temps de m'écouter vous raconter mes manip de thèse en long et en large, même lorsque vous n'aviez pas franchement envie de réfléchir, juste pour me faire plaisir parce que vous savez à quel point mon sujet me passionne. Merci d'avoir hoché la tête même quand vous ne compreniez rien à mes manip ou que ça vous dégoutait ! Merci d'avoir toujours été là pour moi et d'avoir toujours cru en moi.

Papou, mamounette, je crois qu'aucun mot ne sera jamais assez suffisant pour vous remercier d'être des parents absolument extraordinaires. Merci d'avoir été là, à chaque étape, chaque marche, chaque chute, chaque doute, chaque réussite, chaque pleure (et dieu sait que les 2 années qui viennent de s'écoulées n'ont pas été faciles). Merci de m'avoir toujours soutenue dans chacun de mes choix, de continuer de grandir avec moi chaque jour, de toujours me pousser à donner le meilleur de moi-même et être quelqu'un de bien & droit, de ne jamais cesser d'être des parents poules (même lorsque cela me fait râler), de toujours me rappeler d'où l'on vient et ce que l'on est capable de faire. Merci

pour chaque rire, chaque blague pourries, chaque sms d'amour dans les moments les plus rudes. Un genou à terre jamais les deux, rien n'arrête un Dalmasso. Je vous aime S si fort.

A mes neveux d'amour, merci d'être de vraies bulles d'oxygène dans ma vie.

A mes ami.e.s,

Vous êtes bien trop nombreux pour que je vous fasse une dédicace de 5 lignes à chacun (ce qui ferait sûrement 30 pages de remerciements ...) ; sachant que je serais incapable de me borner à 5 lignes ! Vous avez tous été si important pour moi pendant ces 4 dernières années (parfois bien plus). Votre amitié m'est très précieuse et je me sens extrêmement chanceuse de vous compter dans mon entourage proche. Je vais tenter un remerciement groupé donc...

A mes amis, hors faluche, Merci d'avoir croisé mon chemin et d'avoir toujours été une oreille attentive et un vent d'air frais quand l'air été trop étouffant. Merci d'avoir supporté mes ralerics, mon humour douteux, mes bêtises pour décompresser. Merci d'avoir toujours respecté mes convictions et de ne jamais avoir été insistants quand je ne pouvais pas vous voir pendant ma thèse. Et merci d'avoir répondu présents chaque fois que j'ai eu besoin de changer d'air. Je souhaite que nos chemins restent entremêlés encore longtemps.

A mes amis faluchards, vous savez à quel point je suis reconnaissante à la faluche de nous avoir regroupés et d'avoir fait de « parfaits inconnus saouls » des amis sincères, qui ont grandi avec moi et avec qui je compte encore partager tous les moments importants de ma vie. On voit souvent notre folklore pour ses mauvais côtés mais on oublie bien souvent les liens d'amitiés, parfois fraternels, qui se tisse autours de valeurs communes. Alors merci d'être encore aujourd'hui à mes côtés.

Enfin, à mon capitaine Tatougaché, tu sais, je sais, nous sachons. Je t'aime chouchou & merci pour les bouteilles de pizza.

Productions scientifiques et missions

Publications

Dalmasso J., Laquerrière A., Gonzalez B., Gil S., Review: Alcohol-related diseases and foetus-placenta interface. Submission dans Reproductive Toxicology.

Dalmasso J., Guibourdenche J., Vaiman D., Gil S., Placental alcohol exposure programs massive functional and endocrine dysfunctions in the trophoblast. Under Review dans AJOG au 01/08/22

Dalmasso J., Gil S., Neuro-receptors in human placenta, an overview. En preparation

Dalmasso J., Gil S., Placental Alcoholism Syndrom: A new axis in research of FASD biomarker. En preparation

Communications orales

Année	Titre	Auteurs	Occasion
2022	La fonction endocrine trophoblastique : indicateur biologique de la toxicité de l'alcoolisation prénatale sous-estimé ?	Jessica DALMASSO, Bruno GONZALEZ, Jean GUIBOURDENCHE, Sophie GIL	Communication Orale à la journée des jeunes chercheurs en toxicologie de STCM (Société de Toxicologie Cellulaire et Moléculaire) Webinaire
2021	Characterization of placental Alcohol biomarkers during pregnancy and impact on the human placental functions	Jessica DALMASSO, Camille SAUTREUIL, Christelle SIMASOCHI, Françoise VIBERT, Audrey CHISSEY, Jean GUIBOURDENCHE, Thierry FOURNIER, Bruno GONZALEZ, Sophie GIL	Communication orale FHU Senec, CHU Créteil (94)
2021	Caractérisation de biomarqueurs	Jessica DALMASSO, Camille SAUTREUIL, Christelle	Communication orale GFP (Franco-

	placentaires d'alcoolisation au cours de la grossesse et impact de l'alcool sur les fonctions placentaires essentiels au bon développement du fœtus	SIMASOCHI, Françoise VIBERT, Audrey CHISSEY, Jean GUIBOURDENCHE, Thierry FOURNIER, Bruno GONZALEZ, Sophie GIL	placentaire) Nantes (44)
2021	Caractérisation de biomarqueurs placentaires d'alcoolisation au cours de la grossesse et impact de l'alcool sur les fonctions placentaires essentiels au bon développement du fœtus. Comparaison des effets observés sur le placenta lors d'une alcoolisation <i>in utero</i> avec ceux observés dans le cas d'une prématurité.	Jessica DALMASSO, Camille SAUTREUIL, Christelle SIMASOCHI, Françoise VIBERT, Audrey CHISSEY, Jean GUIBOURDENCHE, Thierry FOURNIER, Bruno GONZALEZ, Sophie GIL	1er prix de communication orale, concours jeunes chercheurs du FHU prématurité, Maternité de Port Royal (75)

Mission d'enseignement

Mission d'enseignement 2020-2022 (86h) – Université Paris Cité

Enseignement en Biochimie (TP) niveau LAS- L3 Biologie-DFGSP3

Encadrements de 2 étudiants

- Stage de 2 mois, Niveau Master 1 : Rebeccah Néhard (DFASP1)
- Stage de 6 mois, Niveau Master 2 (interrompu par la crise covid19) : Nhut-Thanh Van

Formations

- Formation « S'approprier DocPro pour valoriser ses compétences doctorales » (3.5h) 2022
- Certification DOCTENS (15h) 2021
 - Scénariser mon enseignement
 - Motiver mes étudiants
 - Activés de groupe
 - Rendre mes cours interactifs
 - Hybrider mes enseignements
- Journée d'initiation à la pédagogie et l'enseignement (6h) 2020
- Formation « rédaction d'articles scientifique et prise de parole en anglais » 18h (2020)
- Séminaire d'intégrité scientifique (8h) 2020
- Formation « Réussir sa thèse en Biomédicale (Zotéro/Pubmed) (6h) 2019

Engagement associatif

Représentante de l'association des doctorants de l'université de Paris « les Cartésiens » à la Confédération des Jeunes Chercheurs (CJC) pour la défense des droits des doctorants et jeunes chercheurs de France. (2019-2022).

- Participation à la journée du doctorat (ENS, Paris, 2021) organisée par le MESRI
- Participation à la rédaction des « Propositions d'amendements sur le projet de LPPR par la Confédération des jeunes chercheurs » (2020) et défense des amendements au Sénat (Paris).
- Représentante de la CJC lors de l'entretien par le Dr Sgard pour l'OCDE dans le contexte de « précarité des carrières des chercheurs dans le secteur public à partir de la fin de réalisation du doctorat » 2020
- Représentante de la CJC lors de l'entretien par RL Benichou pour l'AEF sur la « Condition des doctorants dans le plan de déconfinement prévu par le MESRI » 2020

Résumés

Résumé : Le Syndrome d'Alcoolisme Placentaire : impact fonctionnel de l'alcoolisation *in utero*

En France, le syndrome d'alcoolisme fœtal (SAF) touche 2‰ des naissances. C'est une atteinte sévère, caractérisée par des anomalies morphologiques, des atteintes neurologiques sévères et des troubles neurocognitifs et neurocomportementaux, qui sont en général la conséquence d'une consommation d'alcool chronique pendant la grossesse. Cependant, des femmes consomment de manière « involontaire » en début de grossesse, de manière « festive » en dose unique ou de manière sporadique. Au jeu du hasard de l'exposition *in utero* à l'alcool, certains enfants ont développé des troubles neurocognitifs et neurocomportementaux. L'ensemble de ces troubles causés par l'alcoolisme fœtal (TCAF) a permis un nouvel axe d'étude de l'exposition prénatale à l'alcool (EPA). En France, les TCAF représentent 1% des naissances et leur diagnostic est ardu et souvent tardif du fait de l'absence d'anomalie morphologique. Dès lors, l'enjeu majeur de la recherche sur la toxicité de l'alcool est de trouver des biomarqueurs d'exposition *in utero* pour détecter et prendre en charge précocement ces enfants. Le projet AlcoBrain, porté par le Dr Gonzalez, a pour but d'étudier en première ligne la toxicité de l'alcool sur le placenta et le cerveau fœtal dans un modèle murin. Le placenta est un organe transitoire essentiel au développement et à la croissance du fœtus. Il assure différentes fonctions, dont le rôle de barrière sélective vis-à-vis d'agents pathogènes et toxiques maternels. L'alcool, après absorption, atteint rapidement la circulation utero-placentaire et traverse aisément les membranes afin d'être distribué à l'ensemble des tissus fœtaux. Ainsi, il devient indispensable de rechercher des biomarqueurs d'exposition prénatale à l'alcool et le placenta pourrait être un candidat idéal dans cette quête. Très peu d'études concernent l'effet de l'alcool sur le placenta humain. Le but de ce travail a été d'étudier l'impact fonctionnel de la consommation d'alcool pendant la grossesse sur le placenta humain. Les résultats de ces travaux de recherche ont été orientés selon trois grands axes. Le premier a été la description du syndrome d'alcoolisme placentaire (SAP) et notamment l'étude de l'impact de l'alcool *in vitro* et *in vivo* sur les fonctions placentaires essentielles au cours de la grossesse (fonction endocrine, fonction de transport de molécules, fonction métabolique). Le deuxième axe a été de décrire la neuroplacentologie, avec notamment la cartographie de récepteurs neuronaux dans le placenta humain, l'impact de l'alcoolisation *in vivo* sur cet axe placenta-cerveau et des voies de signalisation essentielles à la mise en place du réseau cortical. Enfin le troisième axe a été la recherche de biomarqueurs

placentaires d'alcoolisation au cours de la grossesse, en lien avec les recherches du Dr Gonzalez et son équipe sur le modèle murin, ainsi que sur l'étude de la toxicité de l'alcool sur les voies impliquées dans survie cellulaire du placenta. En conclusion nous avons montré que l'alcool impacte considérablement les fonctions placentaires essentielles au bon développement du fœtus et particulièrement en lien avec le cerveau ; ces résultats nous ont permis d'obtenir des caractéristiques mesurables de l'alcoolisation *in utero* et identifier clairement les mécanismes fonctionnels de la toxicité de l'alcool sur le placenta au cours de la grossesse.

Mots clés :

Biomarqueurs d'exposition prénatale à l'alcool- Troubles de la grossesse- Exposition fœtale à l'alcool -TCAF- toxicité placentaire- Biomarqueurs -Placenta- biomarqueurs placentaire- Développement neuronal - Axe placenta-cerveau -neuroplacentologie

Abstract: Placental Alcoholism Syndrome: functional impact of *in utero* alcohol exposure

In French, fetal alcohol syndrome (FAS) affects 2‰ of births. FAS is a severe condition, that involves morphological abnormalities, brain impairment and social and behavioural disabilities, which are usually the result of chronic alcohol consumption during pregnancy. A growing number of women consume alcohol involuntarily at the beginning of their pregnancy or at festive occasions in single doses or sporadically. These random, risky behaviours have produced children with various neurocognitive, neurobehavioral, and social disorders. A new focus of research on prenatal alcohol exposure has emerged as a result of these foetal alcohol spectrum disorders (FASD). (FASDs). In French country, FASD affects 1% of births and their diagnosis is difficult and often delay due to the absence of morphological abnormalities. Therefore, the major challenge in alcohol toxicity research is to identify the biomarkers of foetal alcohol exposure *in utero* in order to detect and treat children with these syndromes as early as possible. The AlcoBrain project, led by Dr Gonzalez, aims to study, on the front line, the toxicity of alcohol on the placenta and fetal brain in a mouse model. The human placenta is a transient organ that essential for the development and growth of the fetus. As the only interface between the mother and the foetus, it performs various functions, including the role of a selective filter to maternal pathogens and toxic agents. Alcohol, after absorption, quickly reaches the utero-placental circulation and passes freely from the maternal blood to the placental villi, allowing it to rapidly enter the foetal circulation. Thus, it becomes essential to search for biomarkers of prenatal alcohol exposure and the placenta may be a potential source for this quest. Very few studies concern the impact of alcohol on the human placenta. The purpose of this work was to study the functional impact of alcohol consumption during pregnancy on the human placenta. The results of this research work were articulated around three main axes. The first was the description of placental alcoholism syndrome (PAS) and in particular, the study of the impact of alcohol *in vitro* and *in vivo* on the essential placental functions during pregnancy (endocrine function, molecule transport function, metabolic function). The second axis was to describe neuroplacentology, including the mapping of neuronal receptors in the human placenta, the impact of *in vivo* alcoholism on this placenta-brain axis and on signaling pathways essential for the establishment of the cortical network. Finally, the third axis was the search for placental biomarkers of alcoholism during pregnancy, linked with the research of Dr Gonzalez and his team on the

mouse model; as well as on the study of the toxicity of alcohol on the pathways involved in cellular survival of the placenta. In conclusion, we showed that alcohol significantly impacts the placental essential functions for the proper development of the fetus and especially in connection with the brain; these results allowed us to obtain measurable characteristics of *in utero* alcoholism and clearly identify the functional mechanisms of alcohol toxicity on the placenta during pregnancy.

Key word:

Alcohol Biomarker- Pregnancy Disorders- Fetal Alcohol Exposure - FASD -Toxicity Mechanisms- Biomarker candidate- Placenta- Placental biomarkers - Neurodevelopment- Placenta Brain Axis- Neuroplacentology

Tables des matières

Remerciements	3
Production scientifique et missions	8
Publications	9
Communications orales	9
Mission d'enseignement	10
Encadrements de 2 étudiants	10
Formations	11
Engagement associatif	11
Résumés	12
Tables des matières	17
Avant-propos	25
Thèse du docteur Ladrague Paul, 1901	25
Alcoolisme et enfants	25
Liste des abréviations	109
Introduction	116
Alcool, santé publique et métabolisme	117
Absorption, métabolisme et élimination de l'alcool par l'organisme adulte :	119
.....	122
Mécanisme de toxicité de l'alcool	122
Alcool et grossesse : santé publique et généralités	124
Grossesse physiologique	126
Risques, pathologies de grossesses et syndromes d'alcoolisation <i>in utero</i>	129
Troubles causés par l'alcoolisme foetal	133
Mécanismes de toxicité de l'alcool sur le cerveau	134
Biomarqueurs d'alcoolisation foetale	138
Le placenta Humain :	141
Généralités	141
Développement et histologie	142
Fonctions endocriniennes	148
hCG (hormone Gonadotrophine Chorionique humaine)	148
Progesterone (PG)	149
PLGF (PLacental Growth Factor)	150

Fonctions d'échanges et de transports	154
Métabolisme placentaire	155
Métabolisation fœto-placentaire de l'alcool.....	158
Alcool, placenta et développement cérébral fœtal	159
Matériel et méthodes.....	164
Patientes, consentement et prélèvements.....	165
Profil des patientes.....	166
Patientes « témoins » ayant accouché à terme	166
Critère d'inclusion des patientes.....	166
Recueil	166
Patientes « Alcool » ayant accouché à terme	167
Patientes « Premier trimestre »	169
Techniques de récupération des différents prélèvements	170
Récupération des produits d'IVG au premier trimestre.....	170
Récupération des prélèvements placentaires au troisième trimestre (Alcool ou témoins)	170
Concentrations d'alcool choisies pour les expérimentations <i>in vitro</i> et <i>ex vivo</i>	172
Expérimentations et manipulations avant les analyses	173
Expériences <i>ex vivo</i>	173
Perfusion placentaire	173
Préparation du matériel et design de l'étude	173
Mise en route de la perfusion	174
Validité de la perfusion.....	176
Expériences <i>in vitro</i>	176
Explants villositaires	176
Culture primaire	178
.....	180
Traitement des cellules	180
Récupération des cellules après traitement	181
Validation du modèle et contrôle de toxicité.....	181
Fixation des cellules pour index de fusion	181
Expérimentations et analyses <i>in vitro</i>	182
Test d'index de fusion	182
Protocole de marquage des cellules	182
Acquisition des images en microscopie à fluorescence	183
Analyses transcriptionnelles.....	184

Extractions d'ARN sur culots cellulaires	184
Extractions d'ARN de villosités	185
Mesure des ARN issus des différentes extractions	185
RTqPCR sur plaques PCR Eurogentec®	186
Rétro transcription d'ARN en ADNc	186
PCR (Polymerase chaine reaction) quantitative	186
Protocole	187
RTqPCR pour plaque Qiagen® RT ² Profiler™ PCR Array	188
Transcription inversée (rétrotranscription) d'ARN en ADNc.....	189
PCR quantitative pour plaque PCR	189
Protocole	190
Analyses Protéomiques	191
Extraction de protéines	191
Dosage de protéines.....	191
Protéome.....	192
Analyse des sécrétions	193
Dosage de l'hCG.....	193
Dosage de la LDH.....	193
Dosage de la Progestérone.....	193
Dosage du PLGF	193
Sécrétome	194
Imagerie.....	195
Immunohistochimie	195
Acquisition des images en microscopie Confocale à fluorescence	196
Statistiques.....	196
Résultats.....	197
Introduction des résultats	198
Partie 1	199
Le Syndrome d'Alcoolisme Placentaire.....	199
I. Contrôles et validation des échantillons placentaires et des modèles utilisés <i>in vitro</i> et <i>ex vivo</i>	201
A. Toxicologie de l'alcool <i>in vitro</i> sur culture primaire et explants villositaires : Dosage de la LDH	201
B. Viabilité cellulaire des cultures de trophoblastes et explants villositaire exposés ou non à l'alcool <i>in vitro</i> : Dosage de l'hCG.....	202

C.	Validation de la fonctionnalité endocrine des des CTVs en culture et explants villositaires, et impact de l'alcool <i>in vitro</i> sur la sécrétion de progestérone par ces deux modèles.....	203
D.	Impact de l'acétaldéhyde <i>in vitro</i> sur la sécrétion d'hCG et de Progestérone (PG) des CTV en culture	204
E.	Impact de l'alcool sur la validation du modèle de perfusion <i>ex vivo</i> et validation des deux groupes d'échantillons	206
F.	Analyses non supervisées en composantes protéiques principales de villosités issues des quatre groupes d'échantillons utilisés pour l'analyse du protéome : Contrôle Terme, Alcool <i>in vivo</i> , 1 ^{er} trimestre précoce et 1 ^{er} trimestre tardif.....	207
II.	Impact fonctionnel placentaire de l'alcool <i>in vivo</i>	209
A.	La fonction endocrine (Article 1)	209
a)	Impact de l'alcool <i>in vivo</i> sur la fusion des CTV	209
b)	Impact de l'alcool <i>in vivo</i> sur la sécrétion d'hCG	212
c)	Impact de l'alcool <i>in vivo</i> sur la sécrétion de progestérone	213
d)	Impact de l'alcool <i>in vivo</i> sur la voie de signalisation des hormones de croissance	214
B.	La fonction d'échanges et transports intra-placentaires.....	218
e)	Impact de l'alcoolisation <i>in vivo</i> sur les transporteurs SLC (premier sous-groupe de transporteurs)	219
f)	Impact de l'alcoolisation <i>in vivo</i> sur les transporteurs ATPbinding, les transporteurs de lipides, vitamines, acides-aminés.....	220
g)	Analyse de la fonction de transport moléculaire.....	220
C.	La fonction métabolique.....	228
h)	Impact de l'alcool <i>in vivo</i> sur l'activité du métabolisme glucidique	228
i)	Impact de l'alcool sur le métabolisme lipidique	229
j)	Impact de l'alcool sur les voies de signalisation ERK/MAPK et PI3K/AKT.....	234
k)	Impact de l'alcool sur la signalisation de la voie mTOR.....	237
	Partie 2 :	241
	Neuro-Placentologie et alcoolisation.....	241
A.	Cartographie placentaire évolutive au cours de la grossesse des récepteurs placentaires de neurotransmetteurs : (Tableaux 15-16-17-18).....	249
B.	Impact de l'alcool <i>in vivo</i> sur l'expression de ces récepteurs (Analyse transcriptionnelle)	250
C.	Impact de l'alcoolisation <i>in vivo</i> sur les voies de signalisation protéique impliquées dans la fonction du développement cérébral.....	252
	PARTIE 3 :.....	256
	Caractérisation de biomarqueurs placentaires d'alcoolisation au cours de la grossesse	256
A.	Impact de l'alcool <i>in vivo</i> sur l'angiogenèse placentaire	258

a)	Impact de l'alcool sur le PlGF.....	258
b)	Impact de l'alcool sur CD146.....	259
c)	Impact de l'alcool <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> sur différents acteurs de l'angiogenèse placentaire.....	262
➤	➤ Impact de l'alcool <i>in vivo</i> sur l'expression de ADAM10 et cartographie évolutive.....	263
➤	➤ Impact de l'alcool <i>in vivo</i> sur l'expression CD44 et cartographie évolutive	264
➤	➤ Impact de l'alcool sur PTEN et cartographie évolutive.....	265
➤	➤ Impact de l'alcool sur l'expression de GCM1 et cartographie évolutive.....	267
B.	Implication de l'alcool <i>in vivo</i> dans les voies de signalisation de l'apoptose cellulaire, senescence et prolifération non contrôlée (implication dans les cancers)	268
➤	➤ Impact de l'alcool sur la signalisation des ROS.....	269
➤	➤ Impact de l'alcool <i>in vitro</i> sur le modèle de perfusion.....	270
➤	➤ Alcool <i>in vivo</i> et activation des voies cancéreuses.....	272
	Discussion.....	274
	Bibliographie.....	308
	Annexe.....	337
	Liste des figures.....	341
	Liste des tableaux.....	353

A l'attention du lecteur,

Avant de vous présenter les résultats de mon travail de recherche, il me tenait à cœur de vous faire découvrir, en avant-propos, le manuscrit de thèse du Dr Paul Ladrage, écrit en 1901. Ce manuscrit présente pour la première fois les effets de l'alcool ingéré par les parents, au moment de la conception pour le père et pendant la grossesse ou l'allaitement pour la mère, sur les enfants. Il est édifiant de voir que les conclusions de ce manuscrit, datant de plus d'un siècle, sont très similaires aux constatations que les scientifiques et professionnels de santé proposent de nos jours. Cet avant-propos a pour intention d'inviter le lecteur à la réflexion quant à 1) la place de l'alcool dans la société malgré sa très haute toxicité mais aussi à 2) l'importance de prévenir, comprendre les effets de l'alcool *in utero* et dépister les expositions prénatales à l'alcool, afin de prendre en charge le plus précocement possible les enfants porteurs de troubles causés par l'alcoolisation fœtal.

Le travail de recherche sur le syndrome d'alcoolisme placentaire que vous pourrez découvrir dans la suite du manuscrit, mis en miroir avec ce travail de recherche du siècle dernier permettra, je l'espère, de mettre en exergue les enjeux primordiaux, économiques et sociaux, de la recherche sur l'exposition prénatale à l'alcool et l'importance majeure de continuer la recherche dans ce domaine d'étude.

Bonne lecture,

Avant-propos

Thèse du docteur Ladrague Paul, 1901

Alcoolisme et enfants

Source gallica.bnf.fr / Bibliothèque nationale



1/ Les contenus accessibles sur le site Gallica sont pour la plupart des reproductions numériques d'œuvres tombées dans le domaine public provenant des collections de la BnF. Leur réutilisation s'inscrit dans le cadre de la loi n°78-753 du 17 juillet 1978 :

La réutilisation non commerciale de ces contenus ou dans le cadre d'une publication académique ou scientifique est libre et gratuite dans le respect de la législation en vigueur et notamment du maintien de la mention de source des contenus telle que précisée ci-après : « Source gallica.bnf.fr / Bibliothèque nationale de France » ou « Source gallica.bnf.fr / BnF ».

/ Les contenus de Gallica sont la propriété de la BnF au sens de l'article L.2112-1 du code général de la propriété des personnes publiques.

D^r PAUL LADRAGUE

ANCIEN INTERNE
DE LA MAISON DÉPARTEMENTALE DE LA SEINE

DÉPÔT LÉGAL
ANCIEN INTERNE
305
Année 1901

Alcoolisme

ET

Enfants

PARIS

G. STEINHEIL, ÉDITEUR

2, RUE CASIMIR-DELAVIGNE, 2

1901

T^{no}
14
(139)



ALCOOLISME ET ENFANTS

T²⁰
T 14 (139)

~~~~~  
HAVRE - IMPRIMERIE A.-G. LEMALE - HAVRE  
~~~~~

D^r PAUL LADRAGUE

ANCIEN INTERNE
DE LA MAISON DÉPARTEMENTALE DE LA SEINE

Alcoolisme



ET

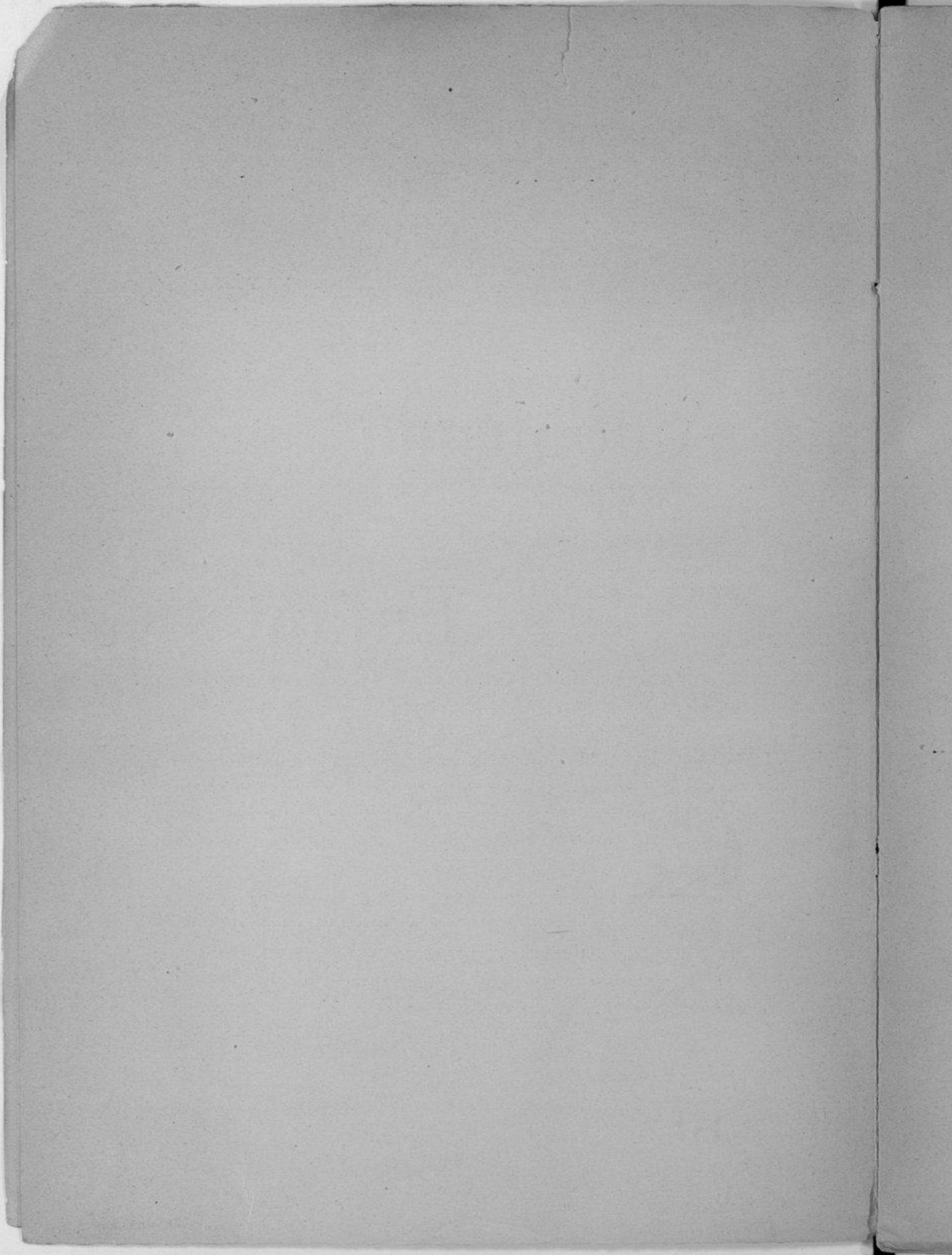
Enfants

PARIS

G. STEINHEIL, ÉDITEUR

2, RUE CASIMIR-DELAVIGNE, 2

1901



ALCOOLISME ET ENFANTS

AVANT-PROPOS

La question de l'alcoolisme est à l'ordre du jour.

Soulevée dès 1852 par le médecin suédois Magnus Huss, elle prend, avec le temps, un intérêt croissant d'actualité.

Depuis quelques années s'organise, en France, la lutte contre « un fléau plus redoutable que les guerres ou les épidémies les plus meurtrières ».

En 1887, M. Claude, au Sénat, et le D^r Gadaud, à la Chambre des députés, avaient répété, en des rapports précis et documentés, le cri d'alarme poussé de tous côtés par les hygiénistes et les médecins.

Dès lors paraissaient nombre de travaux scientifiques ou économiques sur les dangers pathologiques et sociaux de l'alcoolisme. Des discussions s'engageaient. Même quelques projets de lois se succédaient, sans toutefois retenir l'attention des pouvoirs publics.

L'opinion générale demeura presque indifférente.

Mais un jour vint où des voix éloquents proclamèrent, du haut de la tribune parlementaire, la nécessité de ne pas rester plus longtemps inactifs en présence du péril grandissant.

Au mois de juin 1895, le D^r Lannelongue, en un mémorable discours, jette un appel enfin écouté.

Le pays entier s'émeut, et le gouvernement, frappé des observations du D^r Lannelongue, provoque la formation d'une commission (29 juillet 1895).

Cette commission décide le principe d'un enseignement anti-alcoolique dans les écoles, cependant que des sociétés de tempérance se fondent en divers endroits.

Peu à peu l'anti-alcoolisme fait son chemin, non sans peine. Les protestations sont nombreuses. Il est si malaisé de déraciner les vieilles habitudes !

Un nouveau pas a été franchi, tout récemment, grâce à l'augmentation des taxes sur les produits de distillation. Déplorons cependant qu'ait eu lieu, par contre-coup, le dégrèvement des boissons dites « hygiéniques ». Cette mesure, par la sécurité trompeuse qu'elle donne à la population, causera dans l'avenir, nous le craignons, de nouveaux désastres. Combien d'individus sauront à quelles doses modérées le vin, la bière, le cidre demeurent vraiment boissons hygiéniques ?

Nous sommes heureux d'apporter, à notre tour, une modeste contribution à la lutte engagée contre l'alcoolisme.

Chargé du service médical de la crèche à la Maison Départementale de Nanterre, nous y avons observé, à diverses reprises, des accidents d'intoxication alcoolique chez les nourrissons. Ces faits nous ont paru intéressants. Ils nous ont donné l'idée d'étudier, pour notre thèse inaugurale, les effets de l'alcoolisme sur les phénomènes de la génération et sur le développement des enfants.

Ce sujet est particulièrement délicat. Il touche au grand

problème si complexe, si difficile, si controversé de l'hérédité alcoolique.

D'autre part, les effets de l'alcool ne sont pas aussi manifestes chez les enfants que chez les adultes. Pour les dépister, il faut souvent les rechercher avec soin.

En revanche, la question est passionnante. N'est-il pas triste de voir ces petits êtres sans défense subir, dans leur fatale rigueur — et cela, bien souvent, comme nous le montrerons, avant même de voir le jour — les effets d'un empoisonnement qui menace sinon leur vie même, du moins la bonne santé de toute leur existence.

Ces malheureuses victimes de l'ignorance et du vice deviendront moins nombreuses, nous voulons l'espérer, à mesure que les parents seront mieux instruits des terribles conséquences de l'alcoolisme.

Nous allons étudier successivement l'alcoolisme chez le fœtus, chez le nourrisson, chez l'enfant du premier âge.

Sous forme de traitement, nous indiquerons, dans ses grandes lignes, la méthode qui nous semble devoir être suivie pour réduire au minimum, chez nos enfants, ce puissant facteur de déchéance intellectuelle et physique : l'intoxication par l'alcool.

Au cours de cette étude, nous nous tiendrons avant tout sur le terrain médical. Dans les questions de ce genre qui ont pour objet la sauvegarde de la société, le rôle du médecin, de l'hygiéniste est d'inspirer les lois. Il appartient au sociologue, au législateur de les proposer et de les faire appliquer.

Nous tenons à adresser nos plus sincères remerciements à nos maîtres dans les hôpitaux :

A nos premiers maîtres de l'école de Reims ;

A M. le professeur agrégé Gaucher, dont l'énergique direction et les solides enseignements, tant de médecine que de dermatologie, nous furent si précieux au début de nos études. Nous lui avons une profonde reconnaissance ;

A M. le D^r Renault, qui nous apprit la vénéréologie, lorsque nous fûmes son externe à l'hôpital Broca ;

A M. le professeur Pozzi et à son assistant le D^r Jayle, dont nous n'avons pas oublié la bienveillance lors de nos premières études gynécologiques ;

A M. le professeur Alb. Robin, près duquel nous prîmes d'inoubliables leçons de thérapeutique ;

A MM. les professeurs Berger et Terrier, nos maîtres en chirurgie ;

A M. le professeur Pinard, dont nous nous honorons d'être l'élève en obstétrique.

Les excellentes relations que nous eûmes avec le D^r Sape-
lier, pendant notre internat, le fécond enseignement pratique que nous reçûmes dans son service, les conseils autorisés qu'il voulut bien nous donner pour la rédaction de ce petit travail, sont autant de titres pour lesquels nous lui conserverons la plus sympathique gratitude.

Que notre ami Guénard, Interne des hôpitaux, reçoive aussi nos remerciements pour sa cordiale obligeance à notre égard et les conseils précieux qu'il nous prodigua dans la préparation de cette étude.

Alcool et alcoolisme.

Avant d'aborder notre sujet proprement dit, il nous paraît indispensable de préciser ce que nous entendons par alcoolisme. Pour livrer bataille avec succès, il faut connaître son ennemi et son terrain. Nous allons résumer en quelques lignes rapides les connaissances actuelles sur le rôle physiologique de l'alcool dans l'économie, puis nous essaierons de définir les limites de ce domaine malheureusement trop vaste : l'alcoolisme.

Tout d'abord, *l'alcool est-il un aliment ?* Les aliments proprement dits sont les substances dont la cellule a besoin pour réparer ses pertes. La chimie physiologique et la biologie nous apprennent quels sont les éléments indispensables à cette réparation : l'alcool ne figure pas parmi ces éléments.

L'alcool n'est pas directement utilisable par les organes comme réserve d'énergie, à la façon du sucre et de la graisse ; il n'est pas transformable en ces substances ; c'est un produit d'épargne qui possède un certain pouvoir thermogène, mais seulement quand l'organisme le contient en très faible proportion.

« Ne semble-t-il pas étrange d'entendre appeler l'alcool une substance nutritive uniquement parce qu'il possède une valeur calorique considérable et parce qu'il est en

partie brûlé dans l'organisme? On peut, en effet, se demander tout d'abord si la valeur calorique a bien ici la signification qu'on lui attribue et s'il suffit qu'une substance soit entièrement brûlée dans l'organisme pour être considérée comme aliment.

« Un véritable aliment est celui qui est nécessaire à la vie et qui peut être ingéré longtemps sans danger; or, qui, parmi ses plus chauds partisans, oserait soutenir que l'alcool remplit ces conditions? Et si on donne le nom d'aliment à l'alcool ordinaire, l'alcool éthylique, il faut, pour être logique, donner ce nom à l'alcool méthylique, à l'alcool amylique et à d'autres alcools encore, reconnus cependant pour la plupart comme manifestement toxiques!

« Mais il y a plus: c'est au contact des cellules vivantes que se fait la combustion de l'alcool, et les produits intermédiaires de cette combustion (aldéhyde et acide acétique) ne sont certes pas des substances indifférentes à la vie cellulaire. Binz les considère même comme empêchant les échanges chimiques. Il est démontré du reste que l'alcool produit la dégénérescence graisseuse des cellules et finalement leur disparition.

« La propriété attribuée à l'alcool d'être un aliment d'épargne pour l'albumine est tout aussi peu prouvée... » (Bidlot.)

« Les seuls bons effets de l'alcool, dit Debove, c'est d'être un anesthésique et de diminuer la sensation de fatigue.

Il produit aussi une excitation cérébrale qui combat momentanément les peines morales, dissipe les chagrins et amène une gaieté factice; c'est cela qui le fait rechercher avec tant d'avidité.

La croyance répandue dans le peuple, c'est qu'il donne de la force. Jamais l'alcool n'a donné de la force à personne. Ce qui a accredité cette erreur chez les ouvriers parisiens, presque tous alcooliques, c'est que, mis au régime de l'eau, ils se sentent immédiatement affaiblis, au point de ne pouvoir continuer leur travail. Ils en concluent que l'alcool les soutenait.

Le fait est exact, mais l'interprétation est fausse. L'alcool n'a jamais donné de force; ce qui provoque la faiblesse, c'est la suppression du poison alcoolique, c'est-à-dire de l'excitant habituel. Il en est de l'alcool comme de tous les autres poisons, de la morphine par exemple, dont la suppression brusque met le patient dans un état pitoyable. »

C'est, qu'en effet, l'alcool est un poison. « C'est un poison général, mais d'abord un poison du système nerveux. Il a de commun avec les poisons du système nerveux : 1° la révolte de l'organisme à la première intoxication; 2° l'accoutumance; 3° l'action anesthésique et excitante cérébrale; 4° les malaises et les désordres dus à sa suppression brusque.

Ultérieurement à cette action élective et la première en date sur le système nerveux, l'alcool ajoute son action élective sur le tissu conjonctif : il agit comme poison sclérogène ou comme poison lipogène sur les différents organes » (Sapelier).

L'alcool n'a donc aucune valeur alimentaire; de plus, c'est un toxique. Ce toxique peut, à doses modérées, rendre des services dans certaines conditions. C'est en quelque sorte un médicament dont il importe de préciser la posologie et les indications.

À l'heure où des boissons alcooliques sont offertes à la consommation sous le titre officiel de boissons « hygiéniques », il n'est pas inutile, croyons-nous, d'insister sur ce point.

Comme l'a très justement fait remarquer M. le professeur Joffroy, combien, même parmi les médecins, savent quelle est, pour un organisme humain, la dose « dite hygiénique » de l'alcool ?

Car on a voulu donner des chiffres. Pour préciser les idées, pensons-nous, certains physiologistes ont pu dire : la dose hygiénique d'alcool est de un centimètre cube par kilogramme d'individu et par jour.

Il est évident que ces chiffres ne représentent rien d'absolu. Ils ont le tort : 1° de laisser croire à l'utilité « hygiénique » d'introduire dans l'alimentation quotidienne une dose quelconque d'alcool ; 2° de faire prendre pour une moyenne ce qui est en réalité un maximum ; 3° de ne pas mettre en ligne de compte la susceptibilité individuelle dont l'échelle est aussi vaste ici que partout ailleurs.

Précisons notre pensée : tiendrons-nous pour alcoolique celui — et celui-là seul — qui absorbera une quantité d'alcool supérieure à un centimètre cube par kilogramme et par jour ?

Où commence l'alcoolisme ?

Nous abordons de la sorte un problème qu'on peut, avec Ruysen, formuler ainsi :

Dans une société où la majorité des adultes fait un usage plus ou moins abondant de boissons alcooliques, quels sont ceux auxquels nous appliquerons l'épithète : alcoolique ? Autrement dit, au point de vue de la patho-

logie, peut-on assigner à l'alcoolisme une limite scientifique en deçà de laquelle il n'est pas et au delà de laquelle il existe ?

Avec Ruyssen encore, nous proposons la solution suivante : Il y a alcoolisme lorsque, du fait de l'usage continu des boissons alcooliques, l'organisme est entré dans une phase pathologique dont le premier terme est l'accoutumance à ces produits toxiques, et le second l'irrésistible besoin d'en user. La réunion de ces deux termes constitue ce que nous appelons l'alcoolisme latent.

Nous entendons par alcoolisme latent un état d'intoxication de l'organisme qui ne se révèle que par des signes et ne possède pas encore de symptômes propres.

Ne savons-nous pas, en effet, qu'un état maladif de l'organisme peut parfaitement bien exister avant l'apparition de tout symptôme caractéristique, et ne se traduire au début que par des malaises vagues dont le sujet lui-même est à peine conscient ? Il en est ainsi pour le début de l'intoxication par des substances telles que le plomb, l'arsenic, la nicotine, etc... Quand le symptôme type de l'empoisonnement apparaît, il y a déjà longtemps que l'organisme est en souffrance.

L'intoxication par les boissons alcooliques ne diffère en rien des autres. Elle comporte comme celles-ci une forme latente qui a, sinon des symptômes manifestes, du moins des signes indéniables. Nous en démontrerons l'existence et en dénoncerons les conséquences sociales.

Le premier en date de tous les signes de l'alcoolisme latent c'est : l'*accoutumance*. Mettez en présence une substance toxique et un organisme sain, ce dernier réagira

plus ou moins violemment suivant la nature et la dose du poison. La seule interprétation juste qu'on puisse donner du phénomène est celle-ci : c'est une révolte de l'organisme contre l'obligation où on le met d'absorber des substances nuisibles à la vie de ses cellules. Les efforts qu'il accomplit pour en hâter l'élimination en sont une preuve suffisante. Un organisme qui réagit ainsi pleinement contre toute atteinte portée à son intégrité est un organisme sain.

Mais bientôt, que de nouvelles doses lui soient imposées, la réaction perdra de sa violence ; plus tard l'organisme cesse de réagir, l'accoutumance est créée.

Doit-on considérer comme un phénomène normal l'apparition de cette indifférence des cellules à l'égard de substances que nous savons dangereuses ? Assurément non ; toute cellule qui, mise en présence d'un toxique, a réagi tout d'abord violemment, mais qui, peu après, placée dans les mêmes conditions d'expérimentation, vient à témoigner de son indifférence à l'égard de ce même toxique, est *une cellule malade*.

Or telle est l'œuvre de l'alcool, aussi bien que des autres poisons ; il crée l'accoutumance, c'est-à-dire, en quelque sorte, un état de parésie cellulaire qui dénote déjà une altération de l'organisme.

Ce signe, assez sérieux par lui-même, le devient plus encore, quand un signe nouveau et d'une importance majeure, vient se greffer sur lui : *le besoin*.

On répète communément le vieil adage aristotélicien : l'habitude est une seconde nature. Dans le cas qui nous occupe, rien n'est plus vrai ; car l'usage continu de l'alcool,

comme celui de la morphine, crée un « état second » de l'organisme tel que tout l'individu souffre s'il vient à être privé de ces poisons. Tant que ces derniers agissent, tout va bien ; viennent-ils à manquer, l'organisme est en détresse.

Mais il y a un abîme entre l'habitude première nature, qui est toute physiologique, et l'habitude seconde nature, qui, elle, est entièrement pathologique.

C'est justement à cette dernière qu'appartiennent l'accoutumance aux substances toxiques et, à un degré plus élevé, l'irrésistible besoin d'user de ces substances ; et ces deux signes réunis caractérisent amplement l'alcoolisme latent.

« Cet état d'alcoolisme latent ne se manifeste par aucun trouble physique ni mental chez les individus bien portants par ailleurs ; ce n'est pas encore un état pathologique ni nosologique, et cependant ce n'est plus la santé parfaite ni l'intégrité des éléments cellulaires. » (Sapelier).

Ce type d'alcoolisme latent diffère notablement, on le voit, du type clinique d'alcoolisme chronique, connu depuis Magnus Huss et surtout depuis la description magistrale de Lancereaux. Il était important, pour nos conclusions futures, de le bien mettre en lumière.

Nous aurons à revenir sur ce premier degré de l'alcoolisme et à nous demander si cet individu en état d'alcoolisme latent (Ruyssen), d'alcoolisme insidieux (Frantz Glénard), cet alcoolomane, comme le Dr Sapelier propose si justement de le nommer, si cet homme, disons-nous, présente des désordres suffisamment caractérisés pour amener, chez ses descendants, des phénomènes d'hérédité alcoolique.

II

Alcoolisme du fœtus.

La question de l'alcoolisme fœtal est d'une importance capitale : il s'agit, en réalité, de prouver l'existence de l'alcoolisme congénital ou héréditaire.

Cette forme est admise par tous les auteurs actuels et en particulier par ceux dont nous citerons les noms ou rappellerons les paroles au cours de cette étude.

La preuve de l'alcoolisme fœtal repose sur deux ordres de faits se rapportant à l'observation clinique et à la physiologie expérimentale.

Observation clinique.

Deux cas peuvent se présenter, suivant que l'alcoolisme accompagne la fécondation ou qu'il agit sur l'embryon pendant la vie intra-utérine. Avec Guénard, nous distinguerons ces deux cas et nous les examinerons successivement.

PREMIER CAS. — L'alcoolisme accompagne la fécondation.

Dans ces conditions, si nous considérons les géniteurs, nous nous trouvons en présence de deux catégories d'individus. Les uns sont des alcooliques chroniques; les autres

présentent de l'alcoolisme aigu au moment de la conception. On peut se demander, avec le professeur Lancereaux, si c'est l'alcoolisme chronique chez le père qui fait l'hérédité alcoolique chez l'enfant, ou bien si c'est seulement parce que le père était ivre au moment de la conception, que l'enfant deviendra malade.

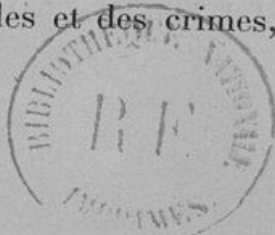
Les géniteurs sont atteints d'alcoolisme chronique.

Cette formule générale peut s'appliquer à l'un des procréateurs ou bien à tous les deux. Nous relevons chez eux des habitudes d'intempérance suffisantes en intensité et en durée pour que cet état d'alcoolisme chronique ait déterminé des troubles permanents, d'ordre anatomique et fonctionnel, dans certains territoires organiques, et plus particulièrement dans les deux systèmes qui interviennent pour la reproduction, l'appareil génital et le système nerveux.

L'enfant dont les parents sont atteints d'alcoolisme chronique sera-t-il frappé de déchéance? Si, dans l'avenir, cet enfant présente des altérations somatiques ou des troubles intellectuels, aurons-nous le droit d'incriminer les ascendants? Pourrons-nous admettre une relation de cause à effet entre la tare des procréateurs et la déchéance du procréé?

Bien des observateurs concluent par l'affirmative et en particulier Vaucley :

Lorsqu'on parcourt les travaux publiés dans ces dernières années sur la folie et la criminalité, on voit se dégager de cette étude deux faits importants et absolument démontrés : d'une part, l'accroissement progressif des maladies mentales et des crimes, et d'autre part, la fré-



quence toujours plus grande de la même cause, l'alcoolisme des parents et la transmission héréditaire.

Ce phénomène moral et social constitue pour l'avenir une menace effrayante, eu égard surtout à l'augmentation incessante de la consommation des boissons alcooliques, notamment des alcools industriels, et au nombre sans cesse croissant des dégénérés et des irresponsables, entraînés par la loi fatale de l'hérédité. Folie, criminalité et alcoolisme marchent de compagnie. Les investigations de la science médicale et les données de la statistique criminelle sont d'accord pour établir la corrélation qui existe entre ces trois facteurs.

Interrogez les médecins, les magistrats, les directeurs de pénitenciers, de prisons, d'hôpitaux ou d'asiles d'aliénés, et tous vous répondront que les trois quarts de ces tristes épaves de la maladie ou du crime sont des ivrognes et que, dans la moitié des cas, se retrouvent les preuves irrécusables de l'alcoolisme des ascendants.

Tout le monde reconnaît que cette loi de l'hérédité alcoolique repose sur des faits positifs et n'est pas le rêve d'un abstinent rigide et austère. Ce que le public ignore généralement, c'est que l'alcool, même à dose modérée, peut amener, chez les prédisposés, des troubles mentaux présentant les signes classiques de l'intoxication alcoolique.

Nous verrons plus loin, en parcourant quelques statistiques, avec quelle éloquence les chiffres viennent malheureusement confirmer la loi de l'hérédité alcoolique.

Cependant, faisons quelques remarques, voire même quelques réserves, au sujet de la loi de l'hérédité alcoolique,

pour le cas particulier où les géniteurs sont atteints d'alcoolisme chronique.

Dans l'état actuel de nos connaissances, est-il permis d'aborder, avec quelque précision, la solution de ce problème social : les parents atteints d'alcoolisme chronique engendrent-ils fatalement un dégénéré?

Et lorsque la dégénérescence de l'enfant existe, peut-on se rendre compte du mode d'action de l'alcool?

L'importance de ces questions est indiscutable. Dans le cas particulier, nous ne voulons pas nier la loi de l'hérédité alcoolique, mais nous cherchons à limiter le champ de ses applications.

Plus loin nous rapporterons les expériences de Nicloux, et nous montrerons que l'alcoolisme des parents entraîne la déchéance de l'enfant lorsque cet alcoolisme préside à la conception, c'est-à-dire lorsque l'alcool lui-même impressionne directement le spermatozoïde et l'ovule.

Ces conditions sont réalisées dans l'alcoolisme aigu. Nous allons en parler dans un instant. En ce qui concerne cette forme d'alcoolisme, il ne saurait y avoir aucun doute. L'alcool agit directement sur les éléments mâle et femelle de la reproduction.

Lorsqu'il s'agit d'alcoolisme chronique, la question est plus complexe. Il n'est pas douteux que, dans la majorité des cas, l'alcoolisme chronique agit à la façon de l'alcoolisme aigu, par intervention directe de l'alcool sur les éléments reproducteurs. Mais il y a d'autres cas où l'alcoolisme chronique n'est pas ou n'est plus en puissance d'alcool au moment de la conception. Ni le spermatozoïde, ni l'ovule ne sont touchés par le poison. Si la mère est abs-

tinente durant toute sa grossesse, si le fœtus ne subit l'influence de l'alcool à aucune période de sa vie intra-utérine, peut-on continuer à admettre dans toute sa rigueur, pour l'enfant ainsi procréé, la loi de l'hérédité alcoolique?

Sur cette question, les observateurs gardent le silence. Elle se pose rarement, il est vrai, dans la pratique, par application de l'adage : « Qui a bu, boira. » Cependant elle n'est pas indifférente en ce qui concerne le mariage des alcooliques.

Voici ce que nous admettrions volontiers :

Pour que l'hérédité alcoolique puisse se manifester, il faut que chez les alcooliques chroniques l'alcool préside directement à la conception. C'est ce qui arrive d'ordinaire. Souvent, par surcroît, l'alcoolisme maternel agit sur le fœtus pendant la vie intra-utérine.

Mais il y a des cas où l'alcoolique chronique n'est pas sous l'influence de l'alcool au moment de la conception. Dans ces cas, surtout quand il s'agit de buveurs déjà anciens, il existe le plus souvent des altérations viscérales de l'individu. Si les altérations sont graves, la question de l'hérédité se complique : l'individu considéré n'est plus seulement un alcoolique, ce peut être un albuminurique, un tuberculeux, etc..., et, dans ces conditions, la loi de l'hérédité alcoolique est indirecte dans ses manifestations.

L'anatomie pathologique nous apprend, par exemple, quels désordres l'alcoolisme produit au niveau de l'appareil génital des buveurs, hommes et femmes.

« Chez l'homme, dit Rœsch, les testicules sont quelquefois frappés d'une véritable atrophie ; ces organes se réduisent au volume d'un haricot ou d'un pois, et

remontent jusqu'à l'anneau inguinal ; le scrotum et la verge sont flasques ; il y a non seulement impuissance, mais absence de désirs. En même temps, le sujet devient simple comme un enfant et sans caractère... Plusieurs fois, il nous est arrivé d'être frappé de l'état de flaccidité et d'atrophie des testicules des buveurs ; mais, en outre, nous avons pu constater, dans bon nombre de cas, chez des individus ayant de trente à cinquante ans au plus, une modification qui portait sur le contenu des tubes séminifères. »

« Chez la femme alcoolique, dit Lancereaux, la menstruation cesse prématurément et, dans plusieurs cas où cette fonction était éteinte avant l'âge, j'ai noté la petitesse du volume des ovaires, et principalement de la partie corticale ou glandulaire de ces organes. »

Ces modifications, peu ou pas différentes de celles que l'on observe chez les vieillards, conduisent à la conséquence que l'action de l'alcool sur les organes génitaux de l'homme produit une sénilité prématurée.

Que cet individu, dont l'appareil génital a subi de telles altérations, vienne à engendrer un enfant, cet enfant pourra naître chétif, petit, malingre ; il réalisera le type de « l'enfant de vieux ». Sera-t-il à proprement parler un hérédo-alcoolique ?

« Les lésions matérielles dues à l'action sclérogène de l'alcool sont, malgré la suppression du poison, rarement susceptibles de régression » (Sapelier). Néanmoins, si ces lésions sont légères, elles peuvent tendre vers la guérison, et si le sujet a abandonné ses habitudes d'intempérance, il n'est pas irrationnel de penser qu'il puisse procréer un être normal.

Une dernière question se pose : l'alcoolique latent, l'alcoolomane donnera-t-il naissance à un dégénéré, à un hérédito-alcoolique ? Cet homme ne paraît pas malade, son intoxication ne donne lieu à aucun symptôme clinique ; dans ces conditions, y aura-t-il chez son fils des effets pathologiques ?

Nous n'hésitons pas à répondre par l'affirmative ; si l'alcool préside à la conception, nous en retrouverons les traces dans la descendance. « On nous parle, avec une admiration évidente, dit M. Jacquet, de ces gaillards « forts comme des chênes » qui ont vécu jusqu'à 90 ans en buvant une bouteille d'eau-de-vie par jour. Mais il faut voir leurs enfants et surtout leurs petits-enfants ; et quant à la génération suivante, c'est bien simple, il n'y en aura pas. »

Les géniteurs sont atteints d'alcoolisme aigu.

Ils ont des habitudes sobres, mais, accidentellement, à l'heure de la fécondation, l'un au moins d'entre eux se trouvait en état d'ivresse.

Cette intoxication toute fortuite et très courte aura-t-elle une influence néfaste sur le produit de conception ?

Les observateurs sont unanimes à l'affirmer.

« Il y a longtemps qu'on a fait cette remarque et le bon Plutarque a déjà dit cela en un passage ainsi traduit dans la langue si savoureuse d'Amyot :

« Ceux qui se veulent approcher d'une femme pour engendrer, le doivent faire ou du tout à jeun, avant que d'avoir bu du vin, ou pour le moins après en avoir pris bien sobrement, pour que ceux qui ont été engendrés de pères sous et ivres, deviennent ordinairement ivrognes, suivant

que Diogène répondit un jour à un jeune homme débauché et désordonné : « Jeune fils, mon ami, ton père t'a engendré étant ivre. » (Debove.)

« Il y a, dit M. Auguste Voisin, une considération qui mérite d'être signalée, c'est que, presque toujours, lorsqu'il m'a été donné de pouvoir découvrir l'intimité de la conception, j'ai appris que dans des cas bien nets et bien déterminés le coït fécondant avait eu lieu pendant l'ivresse du mari. »

« Nul doute, écrit Burlureaux, que l'ivresse des parents au moment de la conception, même en dehors des habitudes d'ivrognerie, ne soit une cause d'épilepsie chez les enfants. Flemming, Burdach, Hufeland, Séguin, Bourneville ont rapporté des observations concluantes. »

Écoutons Dejerine.

« L'influence de l'ivresse, quel que soit le toxique qui la produit, au moment de la conception, n'avait point échappé à Esquirol, Séguin, Morel, Lucas. Récemment Demeaux, Dehaut et Vousgier ont de nouveau étudié cette question et montré, au moyen de plusieurs observations, que l'enfant engendré dans ces conditions peut être aliéné, débile, idiot, épileptique.

Quelque délicat et difficile que soit ce genre de recherches, nous possédons cependant aujourd'hui un assez grand nombre de faits, démontrant qu'une perversion passagère de l'état cérébral, quelle qu'en soit la cause, peut imprimer au nouvel être, conçu dans ces conditions, une modification spéciale qui se traduira plus tard par des symptômes divers, ou analogues à ceux que l'on rencontre chez les vrais héréditaires, c'est-à-dire chez ceux dont les généra-

teurs sont atteints de troubles permanents dans le fonctionnement du système nerveux. »

Guénard pose cette règle générale :

« Quand l'intoxication alcoolique préside à la conception, le sujet procréé est par principe, par définition, frappé de déchéance pour la vie complète. C'est un être taré. »

Combien déplorables, à ce point de vue, sont les libations dont on accompagne volontiers la cérémonie du mariage !

Il nous souvient de quelle fine ironie, M. le professeur Debove soulignait un jour ce contre-sens social. Il nous faisait remarquer comment à des émotions bien légitimes viennent s'ajouter les fatigues de la danse, les repas trop copieux et trop prolongés et surtout les abondantes ingestions de boissons alcooliques, « de telle sorte que le mot mariage est devenu synonyme de noce », et il concluait : « Vénus seule doit présider aux cérémonies de l'hyménée. Il ne faut pas lui associer Bacchus. »

Comme très souvent la défloration s'accompagne de fécondation, on devine quel triste enfant pourra naître de ces parents si fâcheusement déprimés.

Sabatier rapporte « qu'un homme sobre, intelligent et robuste paysan, passa à boire et à manger, comme on le fait dans certains villages des plateaux d'Auvergne, les trois premières semaines de son mariage ; son état resta, pendant tout ce temps, fort voisin de l'ébriété. Neuf mois et demi après, naquit une fille qui n'a pu apprendre à lire et à écrire, toujours de mauvaise humeur, à caractère bizarre et changeant, qui est myope et affectée de nystagmus ».

Les faits de ce genre ne se comptent pas.

DEUXIÈME CAS. — L'alcoolisme accompagne la grossesse.

« La femme enceinte qui s'alcoolise, alcoolise l'enfant qu'elle porte » (Guénard).

A quels signes reconnaît-on l'alcoolisation du fœtus au cours de la grossesse ?

Parcourons les observations suivantes :

OBSERVATION I (BESSIÈRES).

Je me rappelle avoir été consulté par une femme d'environ trente ans qui, se trouvant enceinte, avait pris l'habitude de boire de l'eau-de-vie et cela plusieurs fois par jour. C'était une envie, disait-elle, depuis qu'elle était enceinte, car précédemment elle n'en avait jamais bu !

Elle se plaignait de souffrir beaucoup de mouvements par trop violents de son enfant. C'est alors qu'en l'interrogeant, elle m'avoua sa passion pour l'eau-de-vie. Je lui fis comprendre, en la menaçant d'une fausse couche, tout le danger qu'elle faisait courir à son enfant, si elle ne cherchait pas à se vaincre. Elle suivit difficilement mes conseils ; les mouvements de l'enfant continuèrent ; elle accoucha à huit mois d'une petite fille maigre, chétive et fort peu développée. Cette enfant resta longtemps comme atrophiée et mourut vers l'âge de six ans dans un profond marasme.

OBSERVATION II (GUÉNARD).

Une mère de famille nous avouait, il y a quelques jours, que, sur les conseils de parentes, elle fit, au cours de sa première grossesse, un grand usage de liqueurs fortes. Ces nouvelles habitudes lui étaient particulièrement désagréables ; elle n'y était pas poussée par une de ces envies, œuvres de l'imagination, si fréquentes chez les femmes enceintes. Elle prenait des petits verres

parce que, disait-on, cela était nécessaire pour que l'enfant vînt au monde « blanc et fort ». Cet enfant, âgé de quatre ans, est actuellement bien portant ; mais il fut difficile à élever et, sous des apparences de bonne santé, il cache une prédisposition marquée aux affections ordinaires de l'enfance, troubles digestifs, bronchites et impétigo.

Faiblesse de constitution présentée par l'enfant à sa naissance ; tares pathologiques qui le frappent définitivement ; résistance moindre aux maladies pour l'avenir : voilà les grands traits qui se dégagent de ces deux observations. « Ces enfants, s'ils grandissent, ne seront pas des citoyens dont la patrie aura le droit de s'enorgueillir ; ils resteront chétifs, malingres, exposés à divers accidents nerveux et subiront toute leur vie les tristes conséquences du péché originel. » Tels sont, en effet, les caractères primordiaux et ordinaires de l'alcoolisme congénital ou héréditaire.

Mais là ne se borne point le bilan pathologique du mal hérédo-alcoolique. Beaucoup plus complexe est la série des accidents imputables à l'alcool. Nous allons les passer en revue.

1° *Nullité de la conception.*

« L'ivrognerie étouffe en germe les deux tiers des individus qui auraient dû être procréés » (Lippich).

2° *Mort du fœtus.*

« Sans parler des accidents multiples qui peuvent frapper de préférence toute femme adonnée à l'ivrognerie, nous

devons reconnaître qu'il y a chez elle, par le fait même de ses excès, une cause de mort pour l'enfant qu'elle porte dans son sein » (Bessières).

3^o *Avortement et accouchement prématuré.*

« L'abus du vin par les femmes dont le système nerveux jouit d'une si grande irritabilité est une des principales causes de l'avortement et des fâcheux accidents de la parturition qu'il est si commun d'observer dans les pays vignobles » (Joseph Franck).

« J'ai été frappé de la fréquence des avortements chez les femmes adonnées à l'ivrognerie » (Lancereaux).

Les observations suivantes nous semblent caractéristiques à ce point de vue.

OBSERVATION III (Personnelle).

La nommée R..., âgée de 30 ans, journalière, entre à la Maison de Nanterre en décembre 1900. Elle accuse très nettement des habitudes non douteuses d'intempérance et avoue prendre quotidiennement plusieurs apéritifs et un minimum de deux ou trois litres de vin.

Elle s'est mariée il y a neuf ans, avec un ouvrier charpentier qui était, dit-elle, bien portant, mais se livrait également à la boisson.

On ne trouve dans ses antécédents personnels aussi bien que dans ceux de son mari, aucun signe de tuberculose ni de syphilis. Elle n'accuse également aucune tare nerveuse au point de vue héréditaire.

Cette femme a eu, depuis sept ans, quatre grossesses. Les trois premières se sont terminées par des avortements entre trois et six mois. Nous avons été témoin de la quatrième grossesse dans les circonstances suivantes : le mari de cette femme a été tué dans son travail en novembre 1900, alors qu'elle était enceinte de quatre

mois. Après la mort de son mari elle continua à se livrer à la boisson, et c'est pour vagabondage qu'elle fut amenée en décembre à la Maison de Nanterre.

A son entrée, on constate en effet que le fond de l'utérus est à égale distance du pubis et de l'ombilic : son volume répond donc bien à une grossesse d'environ cinq mois. Cette femme est restée depuis ce temps à la Maison départementale. Ses urines, examinées plusieurs fois pendant sa grossesse, n'ont jamais contenu d'albumine.

La grossesse continua à évoluer normalement pour se terminer en avril par un accouchement spontané, à terme, d'un enfant vivant et bien portant. L'enfant était bien constitué, mais petit. Il pesait 2 kilog. 450 et le placenta 480 grammes.

Les suites de couches furent normales. L'enfant, élevé au sein maternel, a augmenté régulièrement : il pèse aujourd'hui près de 5 kilog.

Cette observation nous a semblé intéressante à rapporter. Étant données les conditions particulières dans lesquelles nous l'avons recueillie, elle démontre, d'une façon très nette, l'influence heureuse du repos, d'une hygiène rigoureuse, enfin et surtout, d'une abstinence complète de boissons alcooliques, sur la marche et la terminaison de la grossesse chez une femme dont on ne peut expliquer les avortements successifs par une cause autre que l'intoxication alcoolique.

OBSERVATION IV (Communiquée par M. GUÉNARD, interne des hôpitaux).

Une jeune femme âgée de 30 ans, mariée depuis six ans à un homme vigoureux, mais grand buveur.

Cette femme a fait cinq fausses couches de deux à cinq mois et, jusqu'à présent, aucune grossesse n'a pu être menée à terme, malgré toutes les précautions prises.

Bien que d'une santé délicate, elle ne présente cependant aucune lésion organique précise. En particulier, on ne saurait invoquer, dans la circonstance, les raisons pathologiques ordinaires de l'avortement : syphilis, tuberculose, brightisme.

Lorsque nous l'avons vue pour la première fois, elle était enceinte de nouveau, de trois mois environ. En l'interrogeant, nous avons appris qu'elle absorbait de l'alcool en grande quantité sous forme de boissons fermentées et même distillées ; ces habitudes d'intempérance, qui sont admises volontiers dans un but utilitaire à l'égard de la mère et de l'enfant qu'elle porte, étaient encore favorisées par le mari qui excitait sa femme à boire.

En présence de l'un et de l'autre, nous avons blâmé énergiquement ces habitudes déplorables et, comme condition nécessaire, sinon suffisante, d'une grossesse normale, nous avons prescrit à la femme l'abstinence complète, tout en réservant d'ailleurs le pronostic, puisque la grossesse était déjà commencée.

Aujourd'hui celle-ci est parvenue, sans accident, au huitième mois. Il y a lieu d'espérer un bon résultat.

Cette observation est intéressante. Sans vouloir prétendre que l'alcoolisme a été l'unique raison des accidents et que la suppression de l'alcool a été le remède radical, il y a certainement entre l'abstinence à laquelle cette femme enceinte s'est soumise et l'évolution normale de sa grossesse, autre chose qu'une simple coïncidence.

OBSERVATION V (Personnelle).

Le nommé Per..., tailleur de pierres, se marie en 1888, à l'âge de 24 ans. C'était alors un fort gaillard, jouissant d'une excellente santé, sans antécédents alcooliques ni tuberculeux dans sa famille.

Sa femme, Jeanne S .., blanchisseuse, âgée de 20 ans, n'a jamais fait aucune maladie. Elle possède encore ses parents qui sont, nous assure-t-elle, bien portants.

En avril 1889, ils eurent un premier enfant, c'était un garçon, bien constitué et très fort. La mère lui donna le sein pendant neuf mois au bout desquels elle le mit au régime mixte : sein et biberon. Cet enfant se développa rapidement sans le moindre accident maladif.

En mars 1891, second garçon gros et fort. La mère, retenue au dehors par son travail, l'éleva au lait de vache le jour, au sein la nuit. Sauf quelques troubles légers de gastro-entérite, au début de sa dentition, cet enfant n'a cessé de se bien porter. Il se montra de bonne heure remarquablement éveillé et intelligent.

Vers cette époque, le mari se mit à boire : vin et spiritueux. Pas d'absinthe. Il se grise quelquefois, mais rarement.

C'est dans ces conditions qu'il est père, en octobre 1895, d'un troisième garçon, né à terme, bien proportionné, mais remarquablement chétif et malingre. Son accroissement se fait lentement, avec des troubles fréquents : vomissements, diarrhée, et à deux reprises des convulsions inexpliquées. A dix mois il contracte la rougeole, à la suite de laquelle apparaît de l'impétigo du cuir chevelu. Mais vers dix-sept mois, dans son deuxième hiver, une broncho-pneumonie menace de l'enlever.

A deux ans, c'est un enfant maladif, petit, qui toussote, n'a pas d'appétit. Il ne marche que depuis peu et prononce à peine quelques mots. « Il est alors, dit la mère, aussi bête que ses frères étaient intelligents. » Quelques mois plus tard, en janvier 1898, cet enfant meurt en quelques jours au milieu de phénomènes méningitiques.

Depuis lors, la mère a contracté, elle aussi, des habitudes d'intempérance qu'elle n'avoue pas, il est vrai, sans beaucoup de réticences. Son mari est devenu « un ivrogne fini ».

Cette femme vient à la Maison départementale en août 1900. Quelques jours après son entrée, elle fait, dans notre service, une fausse couche d'environ trois mois. Pas d'albumine, pas de traumatisme, aucune trace d'infection syphilitique.

La femme Per... croit d'ailleurs que pareil accident lui est arrivé déjà au mois de février de la même année : elle aurait fait à cette époque une fausse couche de six à sept semaines.

Cette femme a quitté la Maison départementale au mois de septembre. Nous n'avons donc pu la suivre.

Ces trois causes : nullité de la conception, mort du fœtus, avortement, ont pour conséquence une diminution sensible de la natalité. Toutes les statistiques s'accordent à montrer une relation inversement proportionnelle entre l'alcoolisme d'un pays et sa natalité.

4° Aspect misérable du nouveau-né.

« Quand l'enfant est petit, proclament les accoucheurs, recherchez l'albuminurie, la tuberculose ou l'alcoolisme. »

5° Mort précoce de l'enfant.

« Les hérédo-alcooliques sont des individus en état permanent de moindre résistance. S'ils naissent parfois sans aucune tare héréditaire manifeste, ils naissent dans un état de débilité générale en tout analogue à ceux que crée la syphilis, par exemple, et qui les rend totalement incapables de lutter contre l'assaut de certaines affections organiques aiguës ou chroniques.

« La moitié des enfants de Londres, issus de parents alcooliques, n'arrive pas à l'âge de 3 ans, tandis que les enfants des Quakers, qui vivent sobrement, atteignent l'âge de 47 ans. »

6° Tares physiques et intellectuelles.

On les observe en proportion considérable dans le 83 à 86 pour 100 des cas, suivant Demme et Rœsch.

Pour se convaincre du fait, il suffit de jeter un coup

d'œil sur les statistiques suivantes, empruntées à plusieurs médecins des maladies mentales.

- Sur 300 cas d'idiotisme des enfants :
 - 143 cas d'alcoolisme des parents (Howe).
- Sur 114 cas d'idiotisme des enfants :
 - 62 cas d'alcoolisme des parents (Demme).
- Sur 244 cas d'épilepsie des enfants :
 - 163 cas d'alcoolisme des parents (De Bourneville).
- Sur 83 cas d'épilepsie des enfants :
 - 60 cas d'alcoolisme des parents (Martin).

Prenons la statistique d'Escheverria : 68 hommes alcooliques et 47 femmes alcooliques donnent le jour à 476 descendants, sur lesquels :

3..... Sourds.	19..... Scrofuleux.
3..... Suicidés.	23..... Mort-nés.
5..... Ataxiques.	23..... Paralytiques.
7..... Strabiques.	26..... Hystériques.
7..... Paralytiques généraux.	79..... Seuls vivent sains.
9..... Choréiques.	87..... Affections diverses.
13..... Idiots de naissance.	96..... Épileptiques.
19..... Fous.	

107 ont succombé à des convulsions dans leur enfance.

Statistique de Legrain :

Sur 761 descendants de buveurs :

322..... Dégénérés.	131..... Épileptiques.
155..... Aliénés.	

La thèse de Combemale contient, sur la descendance des alcooliques des observations remarquables. « Les descendants des alcooliques offrent tous, sauf exception, des phénomènes de dégénérescence, dégénérescence qui se

caractérise par des atrophies partielles, portant, uniquement ou à la fois, sur le corps et l'esprit : anomalies de développement dans la vie intra-utérine, état général faible, intelligence au-dessous de la normale.

L'atrophie, ce caractère initial de la dégénérescence agissante chez les descendants d'alcooliques, peut porter son effet sur les différents systèmes, sur l'ensemble du corps, par exemple, et réduire la stature de toute une famille ; la pâleur du visage, l'absence de poils, l'indécision de couleur des cheveux, la gracilité des membres, la mollesse des tissus, sont encore des caractères de dégénérescence.

Il est bien d'autres expressions de la souffrance de l'état général que nous pourrions énumérer. La multiplicité des maladies chez le même individu, la variété d'expression de cette nutrition alanguie chez les membres de la même famille, avec une dominante toutefois, est chose commune.

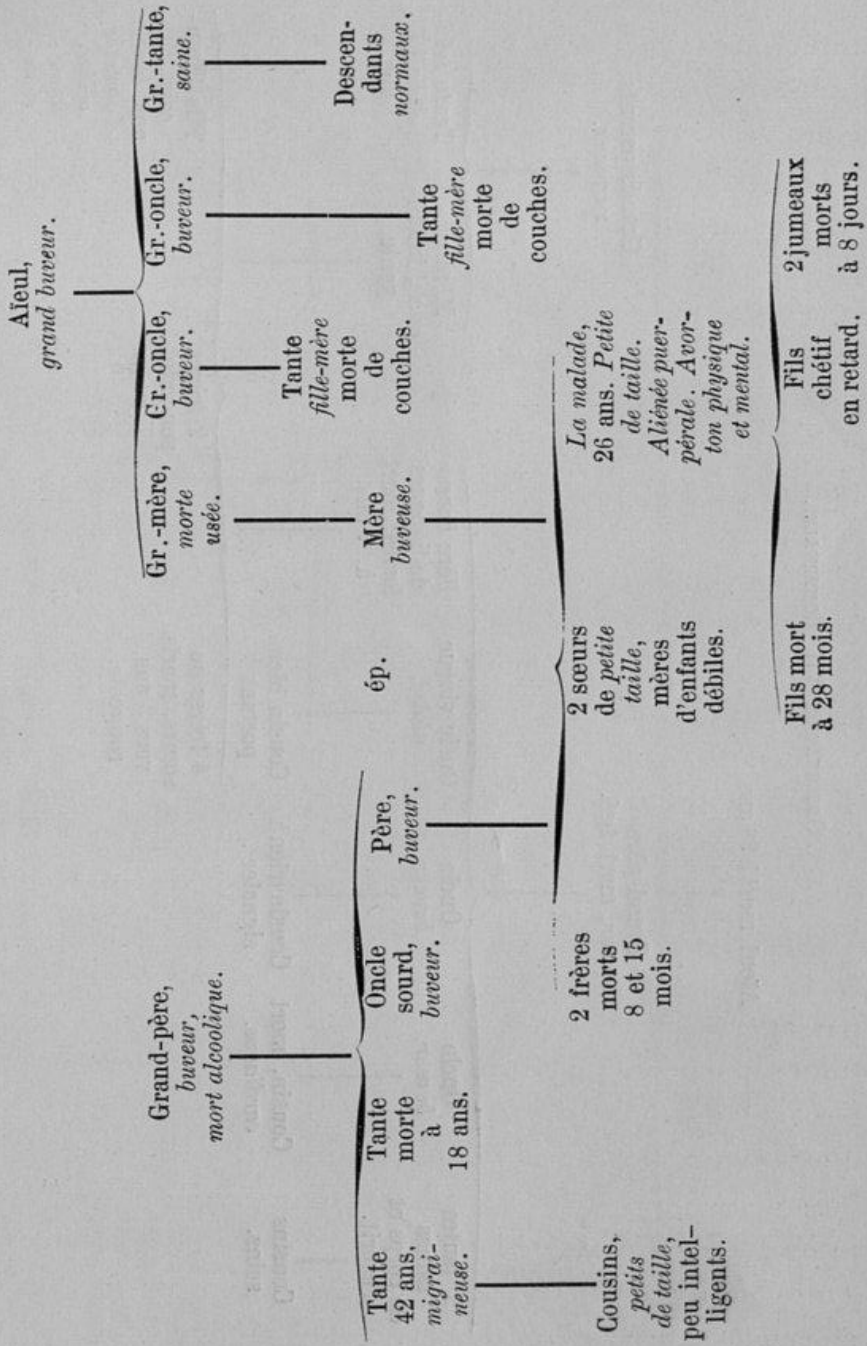
Ces diverses manifestations ont une gradation en intensité ; elles ont aussi un cycle établi pour leur apparition. Les premières, les difformités, les vices de conformation grossière, se produisent pendant la vie intra-utérine et, le plus souvent, sont incompatibles avec la vie dans l'atmosphère. Les secondes, caractères extérieurs de l'individu, tiennent de l'enfance, de l'époque du plus grand développement corporel, elles font du sujet un être anormal, vivant péniblement dans le milieu social. Les troisièmes, degré de résistance à la maladie, surviennent pendant le développement, mais produisent leurs fruits à la puberté, à la maturité de l'âge, et limitent toujours la

durée de la vie ; elles font de l'individu un malade, dont l'intégrité nutritive devient la cause d'une incompatibilité, avant le temps, sociale et vitale.

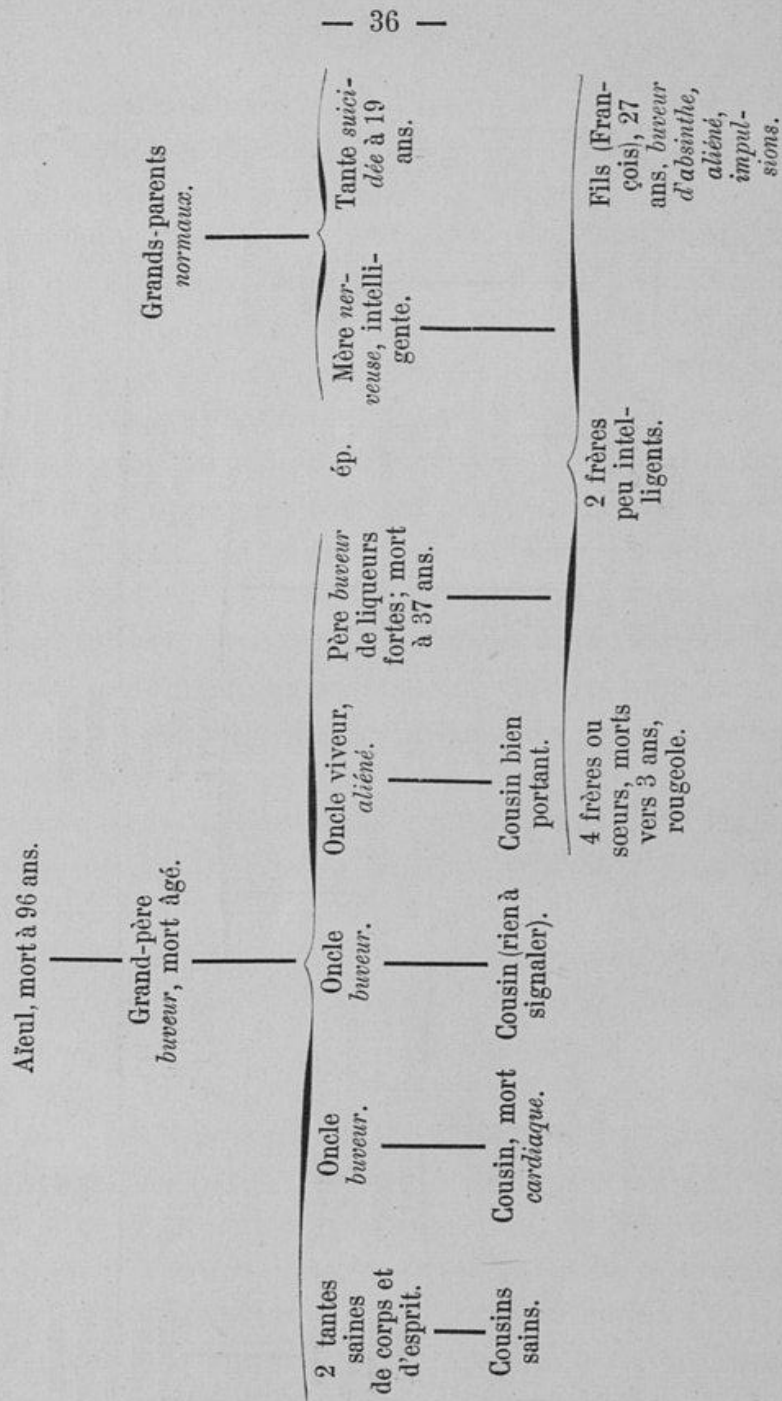
L'alcoolisme traduit son influence sur l'état intellectuel originel de la descendance par des effets incontestables ; chacune des trois grandes facultés de l'âme (l'intelligence, la sensibilité, la volonté) est atteinte dans sa quantité ou sa qualité ; leur fonctionnement isolé ou leur concours habituel, qui fait de chaque homme une personnalité ou un être vivant au milieu de ses semblables, suivant les conventions sociales, est plus ou moins lésé, et cela dès la naissance ; l'éducation, cette génération psychique, est le plus souvent sans ressources contre ces anomalies de l'état intellectuel et moral, et la société doit le plus souvent imputer à l'alcoolisme des géniteurs ces états morbides constitutionnels.

Plus restreintes encore sont ces atrophies dont la perte de la volonté, la diminution du libre arbitre, l'absence ou la perversité de tel et tel sentiment, de telle ou telle faculté de l'intelligence, sont des signes si fréquents. Mais là ne s'épuise pas l'action de l'alcoolisme ancestral : dans le cours de la vie peuvent se montrer des altérations durables ou passagères de la raison, des lésions psychiques ou somatiques particulières, surtout aux époques critiques, enfin des maladies générales ne reconnaissant pas d'autre cause que cet état d'infériorité physique ; et, si l'hérédité est homologue, on retrouve toujours l'aggravation de l'atrophie première. Atrophie originelle ou atrophie acquise dans le cours naturel de la vie, telle est l'expression de la dégénérescence causée par l'alcoolisme des ascendants.

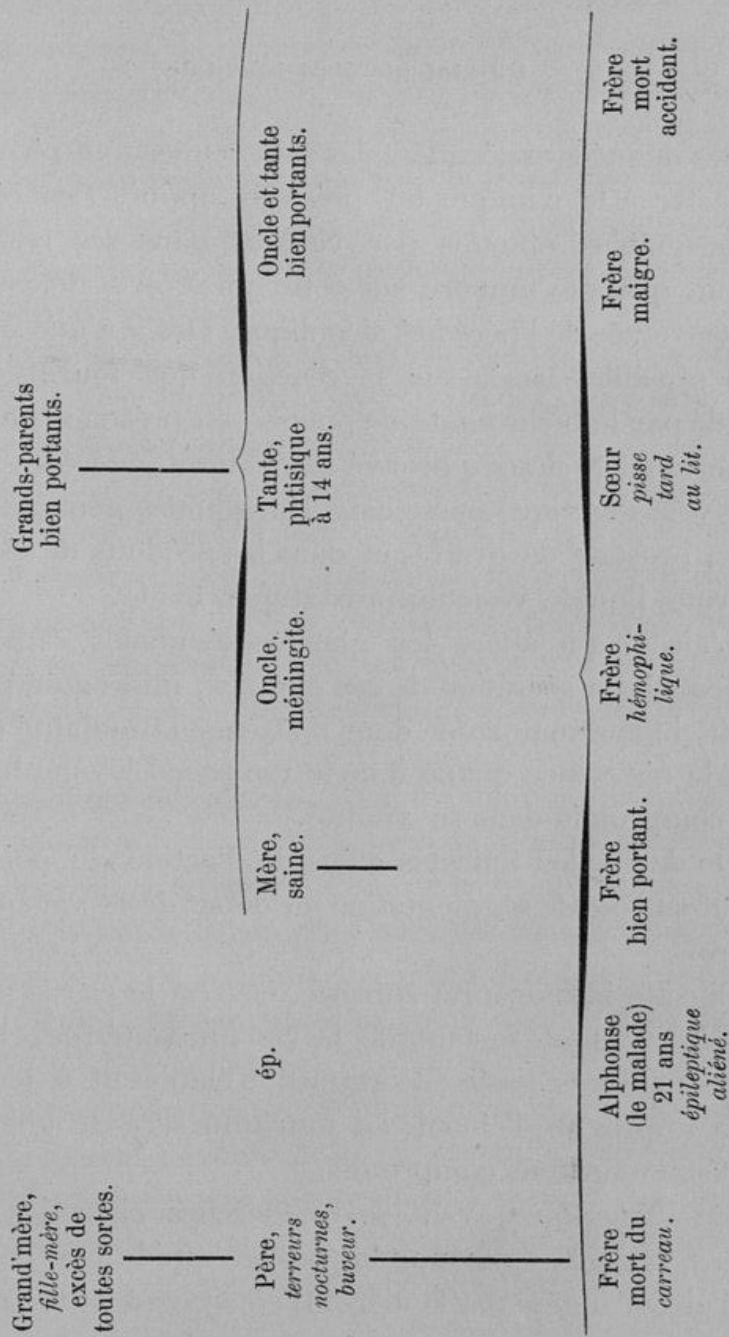
NOLLY VI (COMBEMALE).



OBSERVATION VII (COMBEMALE).



OBSERVATION VIII (COMBEMALE).



Physiologie expérimentale.

Des données expérimentales sont venues tout récemment apporter à la clinique un précieux appui. Les résultats remarquables obtenus par Nicloux dans ses recherches jettent quelque lumière sur cette question si délicate et si controversée de l'hérédité alcoolique. Grâce à une méthode très sensible, basée sur la réaction que fournit l'alcool oxydé par le bichromate de potasse en présence de l'acide sulfurique, Nicloux a prouvé que l'alcool ingéré à 10 p. 100 par voie gastrique passe dans les glandes génitales, testicule, prostate ou ovaire, et dans les produits de sécrétion, sperme, liquide vésiculo-prostatique, ovule.

L'alcool qui altère les glandes séminales et par suite le produit de sécrétion de ces glandes, imprègne, par surcroît, le spermatozoïde dont il atténue la mobilité et affaiblit la résistance quand il ne le tue pas. L'ovule, lui aussi, est compromis dans sa vitalité.

On devine les funestes effets de l'action du poison sur l'œuf en voie de segmentation au début de la vie embryonnaire.

Si cette intoxication subsiste, et c'est le cas le plus fréquent, à chaque instant de la vie intra-utérine, l'enfant, dont les divers tissus et organes s'élaborent à leur tour, sera imprégné d'alcool. La nutrition sera troublée et le perfectionnement compromis.

En effet, poursuivant ses recherches chez des accouchées, Nicloux a reconnu le passage rapide dans l'embryon de l'alcool ingéré par la mère. Il en arrive à conclure :

« L'alcool ingéré passe de la mère au fœtus avec une telle facilité que les teneurs en alcool du sang maternel et du sang fœtal sont sinon égales, du moins très voisines, et de ce fait on est en droit de conclure que les désordres nerveux, ivresse, éréthisme, qui sont la conséquence de l'apparition dans le sang d'une quantité déterminée d'alcool ont, par cela même, une répercussion immédiate sur l'organisme fœtal. »

« Quels qu'en soient la nature, le titre et la quantité, un liquide alcoolique est, pour le fœtus, non seulement inutile, mais encore dangereux. »

L'alcool inutile à la vie extra-utérine l'est aussi, *a fortiori*, à la vie intra-utérine. Le fœtus n'a pas besoin de ce corps étranger calorifique que Nicloux a retrouvé dans le liquide amniotique. S'il produit peu de chaleur, il en perd à peine, sa température reste toujours supérieure à celle de la mère (H. Roger, Bærensprung, Schæffer, Wurster, Lépine).

L'alcool est dangereux. C'est un toxique qui agit particulièrement sur le système nerveux dont il trouble les fonctions calorimétriques. Pour de très petites doses, il est excitant et hyperthermisant; pour des doses modérées, il est déprimeur et hypothermisant; à doses de plus en plus fortes, il devient convulsivant, puis paralytique, tout en maintenant l'hypothermie.

Cette perturbation aura pour effet de compromettre singulièrement l'évolution de ce système, non seulement dans le présent, mais encore dans l'avenir; elle produira des retards, des anomalies, des arrêts de développement. L'embryon, caché profondément dans l'utérus, derrière les

parois abdominales, n'exige pas, pour sa nutrition et sa température, un système nerveux parfait; mais, lorsqu'il quittera l'organisme maternel qui l'abrite, comment pourra-t-il accomplir ses fonctions de nutrition et produire sa chaleur animale avec un système nerveux incomplet? Il ressentira, avec une extrême facilité, le contre-coup des variations de la température extérieure, comme les fœtus venus avant terme et les animaux à température inconstante.

« Lorsque, dit Richet, la température d'un organisme descend au-dessous d'une certaine limite, son activité fonctionnelle diminue tout d'abord, puis, si le refroidissement continue, elle s'éteint définitivement..... La chaleur est donc une condition indispensable à l'accomplissement des actes chimiques réalisés par des êtres vivants. Sans elle, la vie cesse de se manifester, et les organismes succombent faute de l'énergie qui leur est nécessaire. Or si, à l'origine de l'organisation, les basses températures peuvent suspendre les phénomènes chimiques de la vie pour un temps illimité, sans toucher la constitution moléculaire du protoplasma, il n'en est pas de même lorsqu'il s'agit des organismes perfectionnés. Chez ces derniers êtres, le moindre arrêt, la plus légère perturbation, locale ou générale, retentissent sur la vie de l'ensemble et troublent l'harmonie physiologique qui doit exister parmi les divers organes en fonctions. »

III

Alcoolisme du nourrisson.

Observation clinique.

Nous avons vu dans le premier chapitre que l'alcool, aliment nul, toxique certain, ne peut être ingéré par l'adulte qu'à doses fort modérées, sous peine de graves dangers.

Le deuxième chapitre nous a montré les funestes effets de l'alcoolisme sur la reproduction.

Que ce même poison soit également des plus contraires au nourrisson, voilà ce qui ne saurait surprendre.

L'enfant qui ouvre les yeux à la lumière est un être incomplet dont l'organisme, encore inachevé, demande à se développer. Comme le dit Hufeland, on peut appeler le temps qui s'écoule immédiatement après la naissance et pendant la première année, la suite d'une création dont une moitié s'opère dans l'intérieur et l'autre moitié au dehors du sein de la mère. Certains organes, jusqu'alors inactifs, commencent à fonctionner; ils se développent et se modifient; d'autres disparaissent. L'enfant passe dans des sphères d'existence entièrement nouvelles, d'abord dans la vie extra-utérine, puis dans celle des sens, enfin dans la sphère du monde intellectuel. La vie de l'enfant

n'est donc pas un état normal, mais une suite d'efforts pour y arriver. C'est ainsi que le médecin doit la considérer.

On comprend sans peine comment un tel organisme est mal armé pour résister à un empoisonnement, combien son développement sera fâcheusement influencé, voire compromis par l'addition ou la substitution d'un corps étranger toxique à l'unique aliment convenable pour son appareil digestif incomplet : le lait.

Élevé au sein ou élevé au biberon, le nourrisson devient, beaucoup plus souvent qu'on ne se l'imagine, la proie de l'alcoolisme.

Mais les dangers ne sont pas égaux dans les deux cas.

I. — L'intoxication alcoolique rencontre chez les nourrissons élevés au sein des causes particulièrement favorables à son développement.

Parfois ces enfants sont alcoolisés directement. Pour apaiser leurs cris, on leur fait sucer un biscuit, un morceau de pain imprégné d'un liquide alcoolique, même on leur fait avaler à la cuiller quelques gouttes de ce breuvage. Le vin passe, dans certains milieux, pour un adjuvant du travail de dentition. Bessières rapporte qu'à Laybach, dans les États autrichiens, on prétend qu'il faut, dans ce but, donner du vin aux enfants, « la mère dût-elle pour cela vendre jusqu'à sa dernière jupe ».

D'autres fois, l'alcool a été prescrit par le médecin dans un but thérapeutique. Encore que la question soit discutable et discutée, admettons un instant l'utilité réelle, pour le petit malade, d'absorber, dans des conditions bien déterminées, une potion alcoolisée. L'enfant guérit, et dès lors la prescription n'a plus sa raison d'être. Tel n'est pas l'avis

de la famille : puisque ce régime faisait du bien au petit, il faut le lui prolonger. Pendant des semaines et des mois, en cachette au besoin, la mère continuera à administrer à l'enfant sa quotidienne ration d'alcool. Elle croit sincèrement, d'ailleurs, agir ainsi au mieux.

Mais le plus souvent, c'est par le lait de la nourrice que s'alcoolisent les nourrissons au sein. L'alcoolisme du nourrisson découle, conséquence directe et fatale, de l'alcoolisme de la nourrice.

Le fait est certain, quelle que soit la quantité d'alcool absorbée par la mère, quelle que soit la forme sous laquelle est ingéré cet alcool.

Avant que des recherches expérimentales eussent donné à ce fait l'appui d'un contrôle scientifique rigoureux, l'observation clinique avait déjà signalé des altérations de la santé chez les enfants élevés au sein par des nourrices alcooliques.

Quelques observations que nous avons recueillies sont caractéristiques à cet égard.

OBSERVATION IX (*Résumée*; VERNAY, *Lyon médical*, 1872).

Enfant né à huit mois, pesant 2 kilogr. 100, allaité d'abord au biberon. C'est vers le quinzième jour seulement qu'il peut prendre le sein d'une nourrice. Il gagne 150 gr. dans la première quinzaine, 150 gr. dans la deuxième, 320 gr. dans la troisième, 490 gr. dans la quatrième. En tout 1,010 gr., soit un tiers de plus que la moyenne. Il paraît grossir à vue d'œil.

Vers le deuxième mois, l'enfant devient très irritable et présente une hyperesthésie générale marquée. Il a des contractions passagères qui deviennent de plus en plus fréquentes. Le D^r Vernay

décrit ainsi les crises dont il fut le témoin : « Après une courte agitation, l'enfant se raidit dans tout son corps, sa tête se tourna lentement vers l'épaule droite ; la figure s'injecta de sang, se cyanosa même par une suspension de la respiration qui dura bien dix secondes. Alors la face se tourna à gauche, et soudain l'enfant cria comme de douleur ou d'effroi pendant une demi-minute.

« A cette phase tonique succéda une période clonique caractérisée par des contractions très rapides de tout le corps. Tous les muscles de la face y participèrent : la bouche entr'ouverte laissait voir le tremblement de la langue ; la lèvre inférieure, en s'agitant, se repliait vers la langue. Ces contractions étaient légères et ressemblaient plutôt à un tremblement. La face était pâle, la respiration n'était pas suspendue ; cependant, à la fin de la crise, l'enfant avait besoin de faire plusieurs grandes inspirations. Cette période durait de une à cinq minutes.

« Le diagnostic resta en suspens cinq jours pendant lesquels on administra du musc, de la belladone et du bromure de potassium à l'enfant, jusqu'au moment où on découvrit que la nourrice buvait chaque jour six à huit verres de vin pur, d'un vin généreux et capiteux, et de plus, un verre ou deux la nuit.

« On interrompit l'allaitement pendant six jours. On modifia le régime de la nourrice. L'enfant fut tenu à l'abri de la lumière et du bruit, les membres libres. Les crises allèrent en s'espaçant et cessèrent deux jours après. L'enfant reprit alors le sein de la nourrice et depuis se porta très bien. »

OBSERVATION X (CHARPENTIER, *Bull. de la Soc. protectrice de l'enfance*, 1873).

Une femme est accouchée il y a quelques mois, pour la deuxième fois, d'un gros et bel enfant. Pendant les trois premières semaines, cet enfant allait très bien, et la nourrice que j'avais placée moi-même près de cet enfant semblait être une excellente nourrice, qu'lanpa mère me dit un jour qu'elle était étonnée de voir son

enfant, chaque fois qu'il avait tété, être agité, énervé. Au lieu de s'endormir comme faisait son premier enfant, il criait, s'agitait, devenait rouge, en un mot n'avait pas du tout l'aspect habituel des enfants qui ont leur suffisance de lait. J'examinai la nourrice : je n'eus rien à noter. Elle avait un lait abondant et riche en globules. J'engageai à patienter.

Au bout de quelques jours, l'enfant (il avait alors cinq semaines) fut pris d'une éruption très abondante de gourme sur la figure, le cou et une partie du tronc : la peau devint rouge, les garde-robes furent de plus en plus difficiles et enfin, à cette agitation persistante après l'allaitement succéda une fois une véritable crise convulsive dont je fus le témoin sans pouvoir, d'après les phénomènes présentés par l'enfant, attribuer son état à aucune des causes habituelles des convulsions infantines.

Je questionnai alors les parents et tout le monde autour de moi. Les domestiques finirent par m'avouer que l'enfant étant très gros et très vigoureux et tétant beaucoup la nourrice dont le lait avait déjà neuf mois, celle-ci buvait par jour, dans le but de le renouveler, quatre bouteilles de vin qu'elle supportait assez bien pour ne pas éveiller les soupçons de sa maîtresse. Pensant aussitôt à une intoxication alcoolique, je fis surveiller attentivement la nourrice qui fut mise au régime suivant : une demi-bouteille de vin par jour, plus une bouteille de bière, un litre ou deux de tisane d'orge, nourriture rafraîchissante. En quelques jours, l'enfant reprit complètement la santé ; il n'y eut plus d'agitation, plus de convulsions ; en huit jours, la gourme disparut complètement.

OBSERVATION XI (PÉRIER, *Ann. de méd. et de chir. inf.*, 1898).

Le professeur Budin me confiait, il y a quelque temps, un enfant de son voisinage qui venait d'avoir une violente convulsion et pour lequel il avait été inopinément appelé, comme plusieurs médecins voisins, auxquels dans l'affolement général on s'était adressé.

M. Budin n'avait pas mis au monde cet enfant, il savait peu de son histoire, mais avait appris que la mère, jeune étrangère, fortement anémique, pour se donner des forces et... du lait prenait, sur prescription de son médecin, disait-elle, beaucoup de vins de quinquina ou autres et, de son chef, du bordeaux, du champagne, des bières brunes et blondes, sans discernement ni mesure.

Je vis l'enfant à une heure de l'après-midi. Comme il sommeillait, je fis auprès de la « nurse » une enquête qui me révéla ceci : l'enfant né bien conformé et pesant à la naissance 4,800 gr. était nourri, depuis, en partie au sein de la mère, en partie au lait stérilisé du commerce. La croissance avait été de 30 gr. par jour ; il pesait alors 12 livres et avait cinq semaines.

Tout avait été à souhait jusqu'à la nuit précédente où, après avoir pris le sein de sa mère, l'enfant avait eu sa première convulsion. Pourtant la « nurse » avait remarqué que l'enfant, sans être malade, était nerveux, au sommeil agité, au réveil facile ; il semblait être un peu en vibration comme l'entourage, si bien qu'après coup elle déclarait que ce qui venait d'arriver ne l'avait pas trop surprise.

L'enfant s'étant éveillé, je l'examine avec soin et, ne trouvant pas de fièvre (température rectale : 37°,4), rien à la peau, à la bouche ou à la gorge, rien au poumon, rien nulle part qui pût expliquer ces convulsions, je fais donner un lavement qui amène une selle jaune d'or ; je prescris une potion calmante et, l'heure du repas étant venue, je fais mettre l'enfant au sein de la mère. Après une tétée de 60 gr. environ, je fais installer dans son berceau l'enfant qui s'endormait, et je le quitte, promettant de le revoir dans la soirée. Une heure s'était à peine écoulée qu'un coup de téléphone me rappelait en hâte : l'enfant venait d'être repris d'une troisième convulsion plus violente que les précédentes.

Je le trouve effectivement en pleine crise éclamptique : l'attaque dure plus d'une heure, et quand elle paraît céder sous l'influence d'inhalations de chloroforme, elle fait place à un état convulsif permanent entrecoupé de véritables attaques.

Justement préoccupé de cet état, je place auprès du baby

M. Bayeux, ancien interne des hôpitaux, qui devait faire donner un bain sinapisé, un lavement calmant, recourir encore au besoin aux inhalations de chloroforme et parer à toutes les éventualités.

M. Budin, qui veut bien revoir le malade avec moi dans la soirée, pense également que ces convulsions sont dues à une intoxication par le lait alcoolisé de la mère.

La nuit qui suit se passe assez mal ; les convulsions se reproduisaient dès que l'enfant n'était plus sous l'action des calmants. A quinze reprises différentes, nous dit M. Bayeux, de 9 heures du soir à 8 heures du matin, le bébé a été en proie à des attaques extrêmement violentes dont voici les grands traits :

Vingt minutes environ après que l'administration de quelques gouttes de chloroforme l'avaient plongé dans une demi-torpeur, l'enfant poussait un gémissement sourd et aussitôt tout son corps entraînait en violente convulsion tonique qui durait de quinze à vingt secondes ; puis une attaque de clonisme se manifestait ; les yeux étaient tournés en haut, les paupières battaient en larges saccades assez rapides, saccades qui agitaient également les bras et les avant-bras, surtout le bras gauche ; on eût dit que la face et les membres supérieurs étaient sous l'influence de secousses électriques violentes répétées à chaque seconde.

Pendant ce temps, la respiration était complètement suspendue, la bouche fermée avec force, la langue collée au voile du palais et il fut nécessaire à plusieurs reprises d'introduire le doigt derrière la base de la langue pour faciliter les inhalations de chloroforme ; le tonus gagnait bientôt les muscles abdominaux et, en général, la crise se terminait par l'émission de gaz, de matières ou d'un peu d'urine.

Pas d'écume aux lèvres, pas de projection de la langue en avant, pas de cris.

Dans l'intervalle de ces fortes crises, nous notâmes à plusieurs reprises des troubles du rythme respiratoire qui, à certains moments, prit le type de Cheyne-Stockes.

La journée fut déjà meilleure, mais l'enfant était à jeun ; nous conseillâmes la suppression totale de l'allaitement maternel et le

choix d'une nourrice au sein qui conserverait son propre enfant. Celui-ci entretiendrait son lait si le petit malade tétait peu et, s'il venait à succomber, la nourrice ayant son enfant avec elle pourrait aisément se replacer. Quant à la mère, elle ne désirait pas continuer nourrir et surtout elle ne paraissait guère disposée à cesser le régime qui était destiné à lui donner des forces.

Une première petite tétée fut suivie de sommeil, puis l'enfant fut remis au sein toutes les deux heures, et la nuit du 18 au 19 se passa sans nouvelles convulsions. Une petite dose de magnésie nous donna une évacuation normale. Le 20, tout rentrait dans l'ordre.

L'enfant, qui avait perdu environ 200 gr. en trois jours, reprit assez vite et, chose typique, il commença, quelques jours après, à goûter ce sommeil calme, proverbial, des enfants qu'il n'avait encore jamais connu depuis sa naissance.

De ceci on peut conclure que l'usage immodéré de spiritueux que fait la mère ou la nourrice, même dans un but thérapeutique, peut devenir préjudiciable au nourrisson; qu'il importe au médecin d'être très circonspect dans ses prescriptions dès qu'il s'agit de préparations à base de vins généreux, attendu que dans cette voie son ordonnance ne sera le plus souvent que trop bien suivie.

OBSERVATION XII (H. MEUNIER; résumée par le D^r PÉRIER, in *Ann. de méd. et de chir. inf.*, 1898).

Je fus appelé auprès d'un enfant de cinq semaines atteint depuis plusieurs jours de convulsions presque incessantes, qui faisaient craindre un dénouement funeste.

Le petit malade était le deuxième enfant de parents jeunes et bien portants, chez lesquels aucune tare suspecte ne pouvait être relevée. Poids, 4,600 grammes; âge, cinquième semaine. Selles et

urines satisfaisantes, témoignant ainsi, avec la courbe des pesées, d'une alimentation bien réglée et profitable. La seule remarque fâcheuse faite par les parents concernait l'irritabilité de l'enfant qui, depuis quelque temps, devenait nerveux et très impressionnable : il criait souvent, longtemps et rageusement ; mais comme ces cris ne semblaient pas devoir être attribués à la souffrance, on n'y attachait pas d'autre importance : la tétée, du reste, les faisait cesser facilement et le sommeil, bien qu'agité, n'en remplissait pas moins ses délais normaux.

Les attaques ne différaient en rien de l'éclampsie vulgaire des nouveau-nés : elles s'accompagnaient souvent d'émission de matières ; mais, par contre, on remarqua que l'enfant resta toute la première journée sans uriner ; la durée des attaques variait de quelques minutes à une heure et plus.

Dès le premier jour des manifestations convulsives, l'enfant avait été soumis à un examen complet : température, selles, ventre, appareil respiratoire normaux. Pas de traumatisme crânien. Cinq jours s'étaient écoulés depuis le début des accidents quand le Dr Meunier est appelé et, depuis la veille, les crises se succédaient avec une telle fréquence que les attaques étaient, pour ainsi dire, subintrantes : l'état convulsif n'avait plus de rémission.

Son examen reste absolument négatif et il incline alors vers une dernière hypothèse : l'intoxication ab ingestis ; et comme l'enfant n'avait absolument rien absorbé que le lait de sa nourrice, il pousse son enquête sur cette nouvelle donnée. Renseignements excellents sur le genre de vie de la nourrice. Mais une nourrice est prêtée par une famille amie. L'enfant prend une tétée de la nouvelle nourrice et le sommeil est obtenu, sans trop de difficultés, par un lavement chloralé. A son premier réveil, aucune convulsion ne reparut. L'enfant, après une nouvelle tétée, se rendormit facilement, sous l'influence encore active du chloral. La journée du lendemain fut parfaite : les parents, très attentifs, n'observèrent pas la moindre contraction musculaire, et tout rentra dans l'ordre sans autre incident. Une nourrice définitive fut installée : l'enfant est aujourd'hui en excellente santé.

Quelques semaines après, la nourrice, placée comme domestique chez de nouveaux maîtres, fut reconnue comme abusant de vin pur et de café ; et on apprit que dans la première famille, précisément à l'époque où l'enfant avait été pris de ses convulsions, du vin avait été dérobé et que ce détournement ne pouvait être attribué qu'à la nourrice.

OBSERVATION XIII (communiquée par M. GUÉNARD, Interne des hôpitaux).

Enfant de 8 mois, venu normalement à terme, nourri exclusivement au sein. Depuis plusieurs semaines, il digère mal (vomissements, diarrhée), il dort mal, il est surexcité. Ces accidents s'expliquent aisément. La mère, souvent constipée, toujours très altérée, boit beaucoup et absorbe par jour un litre et demi ou deux litres de vin qu'elle coupe avec de l'eau. Le vin ayant été remplacé par de la bière non alcoolisée et des tisanes rafraîchissantes, les selles sont régularisées. Les accidents imputables à l'alcool disparaissent alors chez l'enfant.

OBSERVATION XIV (Personnelle).

La nommée T..., 28 ans, a été admise, il y a quatre mois, à la maison de Nanterre, avec son enfant âgé alors de 8 mois. Nous avons été appelé plusieurs fois par cette femme pour son enfant qui présentait au début des troubles digestifs fréquents. Leur étiologie nous resta longtemps inconnue. Ils consistaient généralement en vomissements alimentaires, accompagnés de diarrhée séreuse ou bilieuse, avec ballonnement du ventre, agitation vive et légère ascension thermique : 37°,7-38°,3.

Après avoir soumis cette femme, qui nourrissait au sein, à une observation attentive, nous avons remarqué que les accidents précédents survenaient régulièrement le dimanche soir ou dans la nuit

suiivante, et généralement aussitôt les sorties de la nourrice : dans l'intervalle, l'enfant présentait toutes les apparences de la santé. Après avoir fait part de cette remarque à l'entourage de la nourrice, nous avons obtenu quelques confidences sur ses habitudes d'intempérance. Nous avons appris que non seulement cette femme buvait au point de rentrer en état d'ébriété, mais que volontiers elle faisait goûter à son enfant toutes espèces de breuvages alcoolisés.

Après avoir observé une série de faits, nous avons soumis cette femme à une consigne rigoureuse : les sorties ayant été supprimées, les accidents ne se renouvelèrent plus pendant près de deux mois. Malheureusement cette femme, malgré nos conseils, quitta dernièrement la maison et nous n'avons pu la suivre.

OBSERVATION XV (communiquée par M. le D^r BRISSART, ancien Interne de la Maison Départementale).

L'enfant R..., âgée de 18 mois, entre dans le service du D^r Sapelier au mois de mars 1900. Cette enfant, élevée au sein, a toujours été bien portante jusqu'alors. Depuis quelque temps, elle présente des phénomènes d'excitation très marqués. Ses nuits sont agitées. Elle pleure très facilement et crie dès qu'on la touche. De plus, ses digestions sont mauvaises et ses selles fréquemment diarrhéiques.

En examinant cette enfant, nous sommes frappé par la fréquence et l'intensité des battements du cœur, au point que nous pouvons un instant nous croire en présence d'une malformation congénitale : un examen minutieux nous fait écarter cette hypothèse.

La température se maintient élevée, oscillant entre 38° et 39°,4.

Nous tentons de combattre cet éréthisme par les différents calmants : bromure, musc, belladone, tout demeure impuissant.

La mère ne quittait pas son enfant placé dans une chambre d'isolement. Au bout d'une dizaine de jours, elle se plaint de ne plus avoir d'appétit, de souffrir de l'estomac et demande un médicament. Nous la mettons au régime lacté.

Deux jours après, les phénomènes d'excitation avaient disparu chez l'enfant. Pourtant nous avions à ce moment suspendu toute médication.

C'est alors qu'en interrogeant plus habilement la mère, nous sommes parvenu à obtenir d'elle cet aveu : que depuis trois semaines environ elle avait pris l'habitude de faire boire quotidiennement à sa petite fille sa propre ration de vin, soit environ vingt centilitres.

Nous nous sommes demandé s'il n'y avait pas de corrélation entre ces faits. Ce qui tendrait à le prouver, c'est que la mère, admonestée par nous, ayant cessé désormais de donner du vin à l'enfant, les accidents ne reparurent plus.

OBSERVATION XVI (Personnelle).

La femme H..., âgée de 22 ans, dont nous connaissions les habitudes alcooliques, nous fait appeler le 11 mai 1901 pour son enfant âgé de 2 mois, qui avait eu des convulsions pendant la nuit.

Cet enfant, né à terme, mais chétif, était élevé au sein par sa mère, mode d'allaitement qui semblait lui réussir, car l'accroissement était satisfaisant.

Des attaques convulsives s'étaient déjà produites quelques jours avant, mais moins accentuées. Le médecin appelé alors avait ordonné des bains qui n'avaient que fort peu calmé l'enfant.

Nous conseillâmes d'essayer à nouveau les bains. Puis, prétextant une mauvaise qualité probable du lait maternel, nous persuadâmes à la femme que l'allaitement artificiel vaudrait mieux pour son enfant.

Elle suivit notre avis et, depuis cinq semaines, les convulsions n'ont pas reparu. De plus, la mère a constaté que son enfant, jusqu'alors très nerveux, était devenu beaucoup plus calme.

OBSERVATION XVII (communiquée par notre ami et collègue
MATHIEU, Interne de la Maison de Nanterre).

Au mois de février 1900, un mardi matin, j'étais appelé au Vésinet, près d'un enfant de trois semaines qui avait été baptisé l'avant-veille. En sortant de l'église, le parrain, pour le réchauffer sans doute, fit absorber à son filleul, dans un café voisin, du rhum et de l'absinthe. De 11 heures du matin à 7 heures du soir, l'enfant fut soumis à cet étonnant régime. Dans la nuit qui suivit, il fut pris de vomissements, de coliques, avec diarrhée verte.

Lorsque je vis cet enfant, son état me sembla des plus alarmants, les vomissements étaient devenus véritablement incoercibles, le ventre était ballonné, dur et douloureux à la palpation, le visage décomposé, livide, l'œil terne. Le corps et les membres étaient couverts de marbrures, les extrémités froides et cyanosées. De temps en temps, des convulsions survenaient. En dépit de tous les soins, l'enfant mourut le mercredi à 2 heures du matin, en hypothermie, épuisé par l'abondance de ses vomissements et de sa diarrhée.

De telles observations suffiraient à prouver une relation entre l'alcoolisme de la nourrice et la qualité de son lait. Les travaux de Nicloux résumés plus loin en ont donné l'éclatante confirmation en démontrant ce fait, ignoré de toutes les mères, peu familier à certains médecins, chauds partisans des « vins toniques », que *l'alcool ingéré passe en nature dans le lait*.

II. — Pour les nourrissons élevés au biberon, les conditions changent un peu. Il est moins exposé, dans les premiers mois surtout. La vraie nourrice ne sait pas, ne peut pas savoir qu'elle présente à son nourrisson un sein

gonflé de liquide alcoolique : la nourrice sèche n'ignore pas, ne peut pas ignorer, sauf le cas d'erreur, qu'elle fait absorber à l'enfant de l'alcool.

Trop nombreuses sont malheureusement les femmes qui, par une étrange perversion d'instinct, substituent au lait, dans le biberon, quelque autre breuvage. Nous en connaissons des exemples. Un de nos amis nous affirmait récemment qu'il n'est pas rare dans la Sarthe, de voir donner du cidre aux tout jeunes bébés. Nous-même avons observé l'an dernier, à la consultation des Enfants-Malades, un enfant de 2 ans élevé par une nourrice mercenaire d'abord, plus tard par la mère, avec du vin.

D'une façon générale, les accidents sont moins nets que chez les nourrissons élevés au sein, car ils sont combinés aux troubles qui proviennent d'un allaitement artificiel presque toujours défectueux. En revanche, ils sont souvent plus rapides, les doses d'alcool ingérées par l'enfant dans ces conditions étant presque toujours relativement considérables.

Si nous voulons grouper, dans leur ensemble, les divers symptômes de l'éthylisme des nourrissons, nous constatons que, par ordre décroissant d'importance et de fréquence, ils se classent de la façon suivante :

Accidents nerveux ;

Troubles gastro-intestinaux ;

Éruptions ;

Altérations de la nutrition générale ;

Prédisposition marquée aux infections.

Ces troubles divers peuvent apparaître isolément : cela

est fréquent pour les accidents nerveux. Assez souvent, quand il s'agit d'alcoolisme datant de quelques semaines ou de quelques mois, les accidents sont associés, combinés.

a) Les accidents nerveux sont parfois légers. L'enfant est grognon, irritable, surexcité. Il s'agite, il crie à tout instant. Son sommeil est mauvais, interrompu par le moindre bruit, par le plus faible heurt du berceau et même sans motif apparent. L'enfant pleure dès qu'on le touche : volontiers on croirait qu'il a quelque mal au point touché. Il n'en est rien. On se trouve en présence de phénomènes d'hyperesthésie généralisée et très accentuée. Cette hyperesthésie a été notée par plusieurs observateurs.

Plus âgé, l'enfant a des cauchemars, des terreurs nocturnes. Les yeux sont ouverts, le regard fixe : durant plusieurs instants aucune caresse, aucune parole ne peut calmer ou rassurer le petit sujet.

Ces accidents n'ont rien de pathognomonique. Pour en dépister l'origine, il faut qu'on songe à l'alcoolisme possible de la nourrice et qu'on pousse une enquête sévère dans ce sens. Pourtant que de fois le diagnostic s'égare ! Rares sont, en effet, les cas où la nourrice confesse son véritable régime. Par honte, par calcul, pour les motifs les plus imprévus, elle se dérobe à l'investigation, elle trompe le médecin sur la quantité, voire sur la nature de ses ingestions quotidiennes de boissons alcooliques. Et ce dernier, s'il ne peut obtenir une surveillance rigoureuse, se voit contraint d'admettre, pour expliquer les accidents, une pathogénie erronée. Il incrimine le travail de dentition, un vice dans l'alimentation, un éréthisme nerveux consti-

tutionnel, etc. Sa thérapeutique demeure naturellement impuissante. La cause subsistant, l'effet se renouvelle et de nouveaux phénomènes vont apparaître, plus intenses et plus graves.

La bonne foi du médecin peut être surprise, alors même que la femme est sincère, alors même qu'un contrôle efficace a été établi. Nous tenons à signaler ici une importante cause d'erreur : elle réside dans l'anormale teneur en alcool de la bière ou du vin qu'absorbe la nourrice. Même parmi les diverses « bières pour nourrices » qui se vendent dans le commerce, certaines sont, à ce point de vue, excessivement dangereuses.

OBSERVATION XVIII (*Résumée*).

Le D^r Petit a rapporté l'observation d'une nouvelle accouchée qui, voulant nourrir son enfant, fit usage d'une bière, dite bière de nourrice.

Le nourrisson présenta bientôt des troubles gastro-intestinaux (vomissements, diarrhée) et de petits accidents nerveux contre lesquels la médication ordinaire n'eut aucun effet.

On suspendit l'usage de la bière et tous les troubles disparurent.

Avec une intoxication alcoolique plus intense ou un nourrisson plus susceptible à l'action du poison, on constate d'autres accidents nerveux plus importants : strabisme, nystagmus, tremblement des paupières, tremblement des membres, tics, enfin et surtout, convulsions.

L'éclampsie infantile déterminée par l'alcool, ne diffère en rien de l'éclampsie des autres intoxications. Ce sont des attaques isolées, présentant trois phases classiques :

tonique, clonique, comateuse. Il n'y a ni morsure de la langue, ni écume, ni cri.

Dans l'intervalle des crises, le système respiratoire peut être troublé, et dans l'observation de Périer et Budin, le rythme de Cheyne-Stockes a été observé.

L'enfant peut tomber dans un véritable état de mal éclamptique. Le nombre des crises croît rapidement : elles deviennent en quelque sorte subintrantes. Il en résulte un état convulsif permanent entrecoupé de vraies attaques.

Pour Meunier, lorsque se manifeste, chez un enfant, un état éclamptique, si cet état est apyrétique et ne s'accompagne pas de troubles gastro-intestinaux, le diagnostic d'intoxication alcoolique s'impose.

b) L'intoxication alcoolique se traduit, au niveau de l'appareil digestif, par des troubles de deux sortes : des troubles gastriques et des troubles intestinaux. Il y a lieu, selon Colleville, de distinguer deux phases, une phase d'intolérance gastrique précédant toujours la phase gastro-intestinale proprement dite.

Cette intolérance gastrique initiale confirme ce que nous disions dans notre premier chapitre : l'alcool est un poison du système nerveux. « L'être humain, instinctif comme l'animal, se défend par une série d'actes réflexes contre la première ingestion d'alcool. A l'approche de l'alcool, son odorat est désagréablement impressionné et il éternue ; si l'alcool est mis dans sa cavité buccale, un mouvement réflexe le fait recracher et une tentative de déglutition provoque la toux pharyngée. Si la déglutition a été accomplie, la régurgitation et même le vomissement peuvent encore arriver à débarrasser l'économie du poison.

« Si toute cette série d'actes réflexes, véritables sentinelles, a pu être franchie, si l'alcool reste dans l'estomac et s'absorbe, il produira à une faible dose des accidents graves, parce qu'il n'y a pas de tolérance » (Sapelier).

Ces accidents seront, suivant le cas, ceux de la gastro-entérite ou les symptômes nerveux que nous venons d'énumérer.

De nos études et des observations que nous rapportons, il nous semble possible de dégager cette règle générale :

Les accidents d'ordre gastro-intestinal se montrent de préférence dans les cas d'intoxication suraiguë, d'intoxication massive. C'est ce qui se produit, en particulier, lorsqu'il y a une ingestion directe d'alcool par le nourrisson. La quantité absorbée en une fois, avec le biberon ou le verre, est plus considérable que celle apportée en une fois par la glande mammaire. La tolérance n'existant pas pour une telle dose, les réactions de défense se produisent. L'organisme se débarrasse en partie du poison : vomissement et diarrhée concourent à ce but.

Dans ces conditions, l'autre partie du poison, la dose absorbée, mise en circulation, peut n'être pas suffisante pour impressionner les éléments nerveux au point de produire la paralysie des centres modérateurs, c'est-à-dire, en clinique, le symptôme convulsions.

Que l'intoxication se produise d'une façon lente, insidieuse, à doses minimales mais répétées, elle se traduira par des phénomènes d'ordre nerveux. C'est le cas de l'enfant au sein. Chaque tétée, sauf le cas d'alcoolisme intense de la mère, ne contient, en somme, qu'une faible proportion d'alcool. Il se passe le phénomène inverse de

celui que nous exposons tout à l'heure. Le peu d'alcool ingéré, dilué dans une quantité de lait, n'éveille pas ou n'éveille qu'insuffisamment le réflexe instinctif : l'acte de défense n'a pas lieu ; d'autant moins que ce mode d'ingestion favorise singulièrement l'établissement de la tolérance.

Mais alors, pourquoi et comment les troubles nerveux ? Nous abordons ici une question mal élucidée.

Le nourrisson au sein, avons-nous dit, s'intoxique par doses faibles ; en revanche il s'intoxique à jet continu ou presque ; toutes les deux à trois heures il prend le sein, et ce sein, pour peu que la nourrice boive entre ses repas, se trouve contenir constamment de l'alcool : Nicloux l'a démontré.

Ainsi l'enfant se trouve plusieurs fois par jour, autant dire en permanence, sous l'influence du poison. Or, et c'est là le point délicat, que devient ce poison ?

Il est un facteur dont l'expérimentation de laboratoire aussi bien que la clinique n'ont pour ainsi dire pas tenu compte et qui cependant, dans la pratique, joue peut-être un rôle important : c'est la possibilité d'un effet de cumul dans l'organisme. Nos connaissances sur l'élimination et la destruction des alcools sont encore rudimentaires, et, pour le moment, il serait difficile d'appuyer cette hypothèse sur des faits positifs. Il ne serait cependant pas impossible que grâce à une durée prolongée de l'action toxique ou à une élimination lente et incomplète du poison, l'absorption répétée de petites doses, insuffisantes par elles-mêmes pour produire un effet appréciable, ne détermine au bout d'un laps de temps plus ou moins long l'explosion d'accidents.

Troubles d'ordre nerveux et troubles d'ordre digestif peuvent d'ailleurs coexister, se combiner, nous l'avons dit déjà; il en était ainsi chez l'enfant observé par Mathieu.

Revenons aux symptômes gastro-intestinaux, ils sont ceux d'une gastro-entérite aiguë : intolérance stomacale prononcée, vomissements alimentaires et muqueux, diarrhée séreuse, parfois bilieuse.

En général, ces troubles cèdent assez aisément à des moyens appropriés dont le premier est la suppression radicale de tout breuvage alcoolique.

Si l'intoxication alcoolique de l'enfant se prolonge ou se renouvelle, on peut se trouver en présence d'une véritable gastro-entérite chronique, forme rebelle qui amène la dénutrition rapide et se termine par l'athrepsie.

c) Des éruptions diverses apparaissent chez les nourrissons alcoolisés : érythèmes polymorphes, furoncles, et surtout l'impétigo, souvent eczémateux, toujours rebelle, qui ne disparaît qu'à la condition de supprimer l'alcool.

d) Le nourrisson alcoolique devient un excellent terrain pour les maladies infectieuses qui sévissent particulièrement chez les enfants : la diphtérie, qui a été observée bien souvent par Demme, les broncho-pneumonies, la tuberculose.

Cette aptitude spéciale du nourrisson alcoolique à subir les infections, trouve son explication dans deux ordres de faits. D'une part, la nutrition générale est, comme nous allons le voir, viciée par l'intoxication éthylique. D'un autre côté, des recherches récentes ont démontré que l'alcool augmente l'alcalinité du sang et diminue par là son pouvoir bactéricide.

e) Les troubles de la nutrition générale sont constants et, dans l'évolution de l'intoxication, il y a, suivant Marfan, deux périodes distinctes :

Dans la première, qui est caractérisée par de petits ou de grands accidents nerveux, sans trouble digestif, sans température, il y a surnutrition : le nourrisson est gros, mou, obèse. Ce fait est des plus importants à connaître. Il y a là une fausse apparence dont il faut savoir se méfier. En effet, la nutrition semble très satisfaisante si on s'en rapporte à la courbe des poids. L'enfant, dans ces conditions, est même souvent au-dessus de la moyenne.

Examiné de près, ce gros enfant est surtout un enfant gras, ce qui n'est point la même chose. Il n'y a là rien qui puisse nous surprendre : nous connaissons l'action lipogène de l'alcool sur l'organisme. On s'exposerait donc à de fâcheuses erreurs si on s'en tenait aux seules données de la balance.

Dans la seconde période, qui est celle de la gastro-entérite, il y a dénutrition et bientôt athrepsie.

En somme, au point de vue de la nutrition, les nourrissons alcooliques profitent mal, irrégulièrement ou trop.

Physiologie expérimentale.

L'alcool ingéré passe en nature dans le lait. C'est ce qui résulte des expériences entreprises par Klingemann et Rosemann, et plus récemment par Nicloux. Suivant les deux premiers auteurs, l'alcool se retrouverait dans le lait dans une proportion de 0,2 à 0,6 pour 100, relativement.

à la quantité introduite dans le tube digestif de la nourrice.

Grâce à sa méthode plus précise, Nicloux a démontré que la proportion était beaucoup plus considérable ; et d'autre part, que toujours l'alcool passe dans le lait, quelle que soit la quantité ingérée, grande ou petite.

Nous insisterons sur ce point, parce qu'il est en contradiction formelle avec les règles jusqu'à ce jour classiques. Les auteurs que nous avons entre les mains, au cours de nos études, enseignaient que l'on peut, sans inconvénient pour le nourrisson, « administrer aux nourrices, à petites doses, des boissons alcooliques de bonne qualité ».

« L'allaitement, écrit Ribemont-Dessaigues, occasionne une soif assez vive que la femme doit satisfaire en prenant du vin, de la bière. » « On voit parfois survenir des troubles graves, des convulsions chez des enfants dont les nourrices abordent une *notable* quantité d'alcool » (Budin).

Il convient aujourd'hui de se montrer plus réservé puisque, nous allons le voir, non seulement l'abus, mais le simple usage des boissons alcooliques durant l'allaitement peut, sans certaines précautions, devenir funeste au nourrisson.

Les résultats obtenus par Nicloux chez les animaux ont été pleinement confirmés par les recherches qu'il a entreprises chez la femme. Nous n'avons pas l'intention de rapporter ici ses expériences si démonstratives : nous nous contenterons d'en indiquer les conclusions au point de vue qui nous occupe.

« Pour 60 centim. cubes de rhum à 45 p. 100 ingérés par une nourrice sous forme de potion de Todd, Nicloux a retrouvé l'alcool dans son lait un quart d'heure après

l'absorption. Il n'y en a, au début, qu'une faible quantité ; puis la proportion devient plus forte : une demi-heure, trois quarts d'heure, une heure après l'ingestion, le maximum quantitatif est atteint et varie de 3 à 4 p. 100, c'est-à-dire que l'alcool est deux ou trois fois plus abondant qu'après le premier quart d'heure. Deux heures après l'absorption, on n'en recueille plus qu'une dose insignifiante. Enfin, après quatre heures ou quatre heures et demie, il n'y en a plus. »

En partant de ce principe que l'enfant ne doit boire que du lait non alcoolisé et que le lait est alcoolisé pendant les quatre heures qui suivent l'absorption modérée de boissons alcooliques chez les nourrices, Guénard s'élève contre l'habitude de donner le sein à l'enfant aussitôt le repas de la nourrice : le lait qui monte après le repas, suivant l'expression consacrée, est un lait alcoolisé quand la nourrice fait usage de boissons fermentées ou distillées.

Lorsque celle-ci prend du vin, trois fois par jour, aux repas du matin, de midi et du soir, le lait qu'elle offre à son nourrisson est alcoolisé quotidiennement au moins douze heures. Dans ces conditions, peu de tétées sont normales. Si la quantité d'alcool absorbé par la nourrice est faible, le nourrisson, en général, sera peu éprouvé ; mais comme d'ordinaire les nourrices boivent abondamment, des accidents surviennent et se répètent après les tétées alcoolisées. Dans plusieurs des observations que nous avons rapportées, les troubles nerveux et les convulsions apparaissent surtout dans la soirée et dans la matinée ; elles doivent être attribuées à l'alcool pris par la nourrice aux repas du soir et du matin.

Si nous posons en principe que le nourrisson ne doit pas absorber de liquide alcoolique, quel qu'il soit, la nourrice doit être abstinente ; si elle consomme du vin, même en petite quantité, il faut que l'enfant, pour son bien, ne prenne le sein que trois heures après le repas. L'usage de la boisson alcoolique doit être très modéré. Dans la vie ordinaire, on peut accommoder les exigences fœtales aux exigences maternelles ; la nourrice ne prendra du vin qu'aux repas de midi et du soir, et l'enfant ne devra pas teter entre midi et trois heures, entre sept heures et dix heures du soir. Comme les tetées sont espacées de deux heures et demi à trois heures, il suffira d'un peu de bonne volonté pour que le nourrisson n'absorbe pas d'alcool.

IV

Alcoolisme de la première enfance.

Pour triompher dans la vie, l'homme doit avoir, suivant le vieil adage, la santé bonne et l'esprit sain. Ces qualités nécessaires s'acquièrent dès le jeune âge. Nous devons, pour les posséder, nous soustraire à toutes les influences qui peuvent s'opposer à leur éclosion ou nuire à leur développement.

L'alcool est une de ces influences, nous l'avons vu.

Lorsque l'enfant est au sein, les parents témoignent, à son égard, une sage réserve ; par instinct et par habitude, plutôt que par raison et par nécessité, ils le nourrissent de lait seulement. Mais, comme le nourrisson pousse vite, ils sont pris du besoin de compléter par des substances étrangères, une alimentation qu'ils jugent insuffisante. C'est pourquoi ils lui donnent, avec largesse, de la soupe, des œufs, de la viande ; le vin est tenu en grande considération, ils lui en font boire. Quelle importance cela a-t-il ? Est-ce qu'un peu de bon vin, du vin bien naturel, peut faire mal ? Le vin est un fortifiant ! Bientôt il remplace le lait.

L'alcoolisme existe chez les enfants sous les formes aiguë et chronique.

Nous n'insisterons pas sur la forme *aiguë*. La littérature médicale possède un certain nombre de cas de delirium

tremens infantile. Des observations de mort subite consécutive à l'absorption de boissons distillées ont été rapportées, par Taylor en particulier. Pour en recueillir, il suffit de parcourir les faits divers des journaux.

L'alcoolisme *chronique* cause plus de ravages. Le facies pâle, les traits tirés, le regard éteint, les mains tremblantes, la parole lente et hésitante, l'aspect malheureux et inquiet, c'est ainsi que se présente d'ordinaire le petit alcoolique. Parfois, son excitabilité est telle que la moindre émotion suffit pour le jeter dans une agitation extrême. Il a perdu la mémoire et ne s'intéresse à rien de ce qui se passe autour de lui.

Les grosses lésions sont rares chez l'enfant alcoolique, car il n'a pas le temps de les faire. Cependant nous connaissons des observations de cirrhose du foie, entre autres, celles de Birch et de Hirschfeld, de pachyméningite hémorragique chez un enfant de 7 ans, de dégénérescence graisseuse du cœur.

Les troubles nerveux sont plus fréquents. Sans compter les terreurs nocturnes, les convulsions épileptiformes, Combe a rapporté des cas de chorée succédant à l'ivresse, vers le septième ou huitième jour. Des cas de diabète ont même été signalés.

Enfin rappelons la grande prédisposition des enfants alcooliques à toutes les maladies infectieuses, locales ou générales, impétigo, gastro-entérite, diphtérie, fièvres éruptives, et surtout tuberculose pulmonaire.

L'alcoolisme de l'enfant se révèle donc exceptionnellement par de grosses lésions.

Il s'agit le plus souvent d'un alcoolisme latent, qui se

manifeste par des altérations lentes et insidieuses de la sphère intellectuelle.

Ainsi compris, l'alcoolisme des enfants est fréquent; une courte enquête suffit pour en convaincre.

Cependant, il existe peu de statistiques; nous citerons celle de Schmidt, de Londres, portant sur les élèves des écoles primaires de la ville de Bonn.

Sur 247 élèves, on n'en trouva aucun qui n'eût déjà goûté du vin, de la bière ou de l'eau-de-vie.

25 p. 100 n'avaient jamais goûté d'eau-de-vie, mais buvaient habituellement du vin et de la bière.

8 p. 100 recevaient chaque jour, des mains de leurs parents, un petit verre d'eau-de-vie pour devenir forts.

Dans nos pays vignobles, les enfants consomment habituellement du vin et de l'eau-de-vie. Dans certains villages, l'écolier reçoit une ration d'eau-de-vie pour arroser son goût. Mais c'est surtout pendant les repas qu'il s'alcoolise. Il éprouve un commencement d'ivresse et, dans cet état, arrive à l'école.

Tout d'abord, il est turbulent, surexcité; ses yeux sont brillants, son visage est vultueux. Il n'est pas possible de le faire tenir tranquille et encore moins écouter. Bientôt, il se calme; une torpeur invincible l'envahit, il tombe sur la table ou sur le banc et s'endort.

Les mêmes scènes se reproduisent chaque jour. Quei écolier! Quelles espérances!

La mémoire s'altère vite; elle cesse d'être prompte et fidèle.

L'enfant s'absente fréquemment, parce qu'il est malade. S'il vient en classe, c'est pour jouer ou pour dormir. C'est

un mauvais élève. A treize ans, il quittera définitivement l'école avec une instruction incomplète, insuffisante, très souvent nulle. Il oubliera rapidement le peu qu'il a appris.

Si nous précisons notre sujet, nous reconnaitrons qu'il y a plusieurs manières pour un enfant d'être alcoolique et pour un écolier de subir les effets toxiques de l'alcool.

Nous observons, tout d'abord, dans les écoles, des enfants alcooliques, nés de parents alcooliques. Ce sont de mauvais écoliers, paresseux, inintelligents et méchants, dont on ne peut rien tirer : ils deviennent souvent des criminels ou des aliénés.

Nous trouvons des enfants nés de parents alcooliques, mais qui ne présentent pas d'alcoolisme acquis. Ce sont de médiocres écoliers ; cependant, avec de la douceur, de la patience et du temps, si la famille vient en aide à l'instituteur, il est possible de leur apprendre quelque chose.

Il y a des enfants nés de parents non alcooliques et qui sont devenus alcooliques dans la suite ; nous en connaissons un certain nombre d'exemples. Voici dans quelles conditions le changement s'opère. D'un premier mariage, une femme est mère de plusieurs enfants indemnes d'alcoolisme héréditaire ; elle se remarie avec un individu alcoolique, qui introduit ses fâcheuses habitudes dans le ménage. Les enfants du premier lit s'alcoolisent. De bons, ils deviennent de mauvais écoliers.

Enfin, la forme même sous laquelle l'alcool est ingéré n'est pas indifférente. Dans une ville industrielle de Champagne, où il existe un certain nombre d'écoles primaires, il y en a deux qui sont situées l'une dans le quartier des tisseurs, l'autre dans celui des ouvriers

cavistes. Les enfants des tisseurs qui boivent de l'eau-de-vie sont en général beaucoup moins intelligents que ceux des cavistes, qui font usage de vin.

Dans les pensions, l'alcoolisme vrai est rare. L'ordinaire et l'abondance que l'on trouve dans les lycées et collèges ne favorise pas son développement. Et la surveillance est si rigoureuse qu'il n'est pas facile de boire en cachette.

Mais si, dans la semaine, le jeune lycéen est sobre, par raison ou par nécessité, il prend sa revanche le jour des sorties. Il mange et boit à l'aise, sous le regard bienveillant et indulgent de ses parents ou de ses correspondants, qui lui donnent en abondance toutes ces bonnes choses dont il est si privé. Les conséquences de ces excès se font sentir le lendemain et même le surlendemain; le travail devient pénible, difficile ou impossible. Nous ne parlons pas des nombreux embarras gastriques qui sont causés par ces habitudes déplorables et qui obligent le pensionnaire à quitter les salles d'études pour l'infirmerie.

En résumé, l'alcool exerce une action déprimante sur les facultés intellectuelles de l'enfant : c'est un ennemi de l'instruction.

Prophylaxie et traitement.*Prophylaxie.*

Le véritable traitement de l'alcoolisme des enfants est le traitement prophylactique.

L'alcoolisme de l'enfance, héréditaire ou acquis, reconnaît deux ordres de causes : l'intempérance des parents ou des nourrices ; leur ignorance ou leurs préjugés.

Deux indications se posent donc :

- 1° Lutter contre l'alcoolisme des parents et des nourrices ;
- 2° Les instruire.

La lutte contre l'alcoolisme, pour être efficace, nous paraît devoir être engagée simultanément sur trois terrains : le terrain législatif, le terrain médical, le domaine de l'initiative privée.

« Quand un fléau menace gravement la prospérité d'un pays, on doit l'attaquer dans ses racines mêmes, et, du même coup, prévenir son extension. On doit diriger contre lui simultanément une médication radicale et des mesures prophylactiques. En un mot, on doit à la fois faire œuvre de thérapeute, d'hygiéniste et de législateur. »

I. — Réformes d'ordre législatif.

Les mesures législatives prises jusqu'à ce jour nous semblent excellentes, mais très insuffisantes.

Nous appelons l'attention des pouvoirs publics sur la nécessité urgente :

1° D'exiger l'application rigoureuse des moyens actuellement en vigueur; de créer, pour enrayer l'extension quotidienne du fléau, de nouvelles réformes économiques et législatives plus énergiques ;

2° De veiller à l'observation sévère des programmes concernant l'enseignement anti-alcoolique dans les écoles et les lycées.

Il serait bon d'insister, dans les leçons, sur ce fait : que l'alcool, déjà redoutable pour l'adulte, est absolument funeste à l'enfant. On préciserait notamment ces deux points : *a)* Le petit enfant ne doit, sous aucun prétexte, goûter aux boissons alcooliques, distillées ou fermentées; *b)* L'écolier ne doit pas faire usage de boissons distillées, sous peine de compromettre sa santé et son intelligence : l'alcool est un ennemi de l'instruction. Seul l'usage modéré de boissons fermentées coupées d'eau peut, à la rigueur, lui être permis.

Il ne nous appartient pas de rechercher les réformes législatives aptes à empêcher les progrès de l'alcoolisme. Nous nous bornerons à énumérer les principales parmi toutes celles proposées : Création d'asiles de buveurs avec internement volontaire. Séquestration d'office. Réglementation des conditions de production et de vente de l'alcool :

impôt, monopole, législation sur les cabarets, prohibition absolue, etc.

II. — Réformes d'ordre médical.

1° Il nous paraît utile d'inviter les médecins à se montrer « très circonspects dans leurs prescriptions dès qu'il s'agit de préparations à base de vins généreux, attendu que, dans cette voie, leur ordonnance ne sera le plus souvent que trop bien suivie ». On a mené grand bruit, ces temps derniers, autour de « l'alcoolisme médical ». Une telle campagne nous paraît assez justifiée. « Les médecins ont, en matière d'alcoolisme, une lourde responsabilité. »

Pour prévenir et combattre l'alcoolisme congénital, Guénard propose les règles suivantes :

a) Défendre le mariage aux alcooliques des deux sexes tant qu'ils sont en puissance d'accidents;

b) Exiger de la femme enceinte une abstinence complète;

c) Exiger de la nourrice une tempérance rigoureuse.

Ajoutons ce corollaire : une mère alcoolique ne doit pas nourrir son enfant.

2° « L'alcoolisme, dit Ruysen, reconnaît en partie pour cause la conception antihumanitaire que les praticiens se font de la médecine. Soigner dans leurs symptômes les affections aiguës et chroniques dérivant de l'alcoolisme, là se borne le plus souvent leur ambition. User de leur ascendant moral pour retirer leurs malades de l'ornière de l'alcoolisme, ils n'y songent même pas. Ils oublient plus encore que, par l'exemple, par la parole, ils pourraient

écarter de cette ornière ceux qui s'apprêteraient à y entrer. Ils n'ont pas même à cœur de déraciner quelques-unes des erreurs qui circulent dans tous les milieux sur les soi-disant bienfaits de l'alcool. Quelques-uns même, et non toujours des moins autorisés, avouent connaître mal la question et n'avoir aucune opinion sur les propriétés des boissons alcooliques... »

Encore que nous estimions ce tableau de Ruysen trop poussé au noir, nous devons reconnaître qu'il contient une grande part de vérité. Le médecin, peut-être mal convaincu lui-même, ne porte pas toujours, comme il le pourrait faire, la bonne parole autour de lui. Pourtant son action forme le complément indispensable des efforts de l'hygiéniste et du législateur.

L'alcoolisme, véritable maladie endémique, menace la prospérité du pays : souhaitons que mieux éclairés sur le péril, les médecins demeurent moins indifférents. Ils peuvent beaucoup pour l'instruction antialcoolique des masses avec lesquelles ils sont en contact direct. Plus spécialement, à notre point de vue, nous voudrions que par eux fussent vulgarisées les notions suivantes :

A. — Par l'alcoolisme habituel des parents ou par leur ivresse au moment des rapports :

a) Le phénomène de la conception est sérieusement compromis ;

b) Si la fécondation a lieu, le produit de conception est gravement menacé dans son développement.

B. — Par son intempérance pendant la grossesse, la femme fait courir les plus grands dangers à l'enfant qu'elle porte dans son sein.

C. — L'alcoolisme de la femme qui allaite a pour conséquence immédiate l'alcoolisme du nourrisson.

III. — Réformes dues à l'initiative privée.

1° « S'opposer à l'extension de l'alcoolisme, péril national, est une œuvre de solidarité qui réclame toutes les initiatives privées et les invite à se grouper pour remettre en honneur cette vertu éminemment sociale : la sobriété. »

Implanter au cœur des hommes la foi dans les bienheureux effets de la tempérance; instruire les jeunes en les préparant à la sobriété : tel est le but que poursuivent les sociétés de tempérance et les sociétés d'abstinence.

Les brillants résultats obtenus dans cet ordre d'idées par toutes les associations de ce genre, imposent aux pouvoirs publics et au corps médical le devoir d'appuyer leurs efforts et de favoriser leur multiplication.

2° Il importe d'autant plus de leur venir en aide qu'elles secondent l'enseignement officiel par tous les moyens dont elles disposent : le journal, la brochure, le livre, les cercles ouvriers et cafés de tempérance, etc.

Traitement.

Il nous reste à nous demander ce que nous ferons en présence des accidents d'intoxication alcoolique.

Convulsions. -- Au moment de l'attaque, on fera des-

serrer les vêtements de l'enfant, on le placera au grand air, la fenêtre ouverte. On donnera immédiatement un lavement d'eau de savon, d'eau salée, ou huileux.

On obtendra aussi d'excellents résultats par les lavements au musc, à l'hydrate de chloral, au camphre ou au chloroforme; par un suppositoire à l'hydrate de chloral.

Le bain tiède ou frais, soit avec du tilleul, soit sinapisé, amènera parfois un profond soulagement.

Dans les cas graves, une sangsue au niveau des mastoïdes ou des malléoles peut être prescrite.

On n'oubliera pas de flageller le corps et le visage de l'enfant avec un linge mouillé, de faire des frictions.

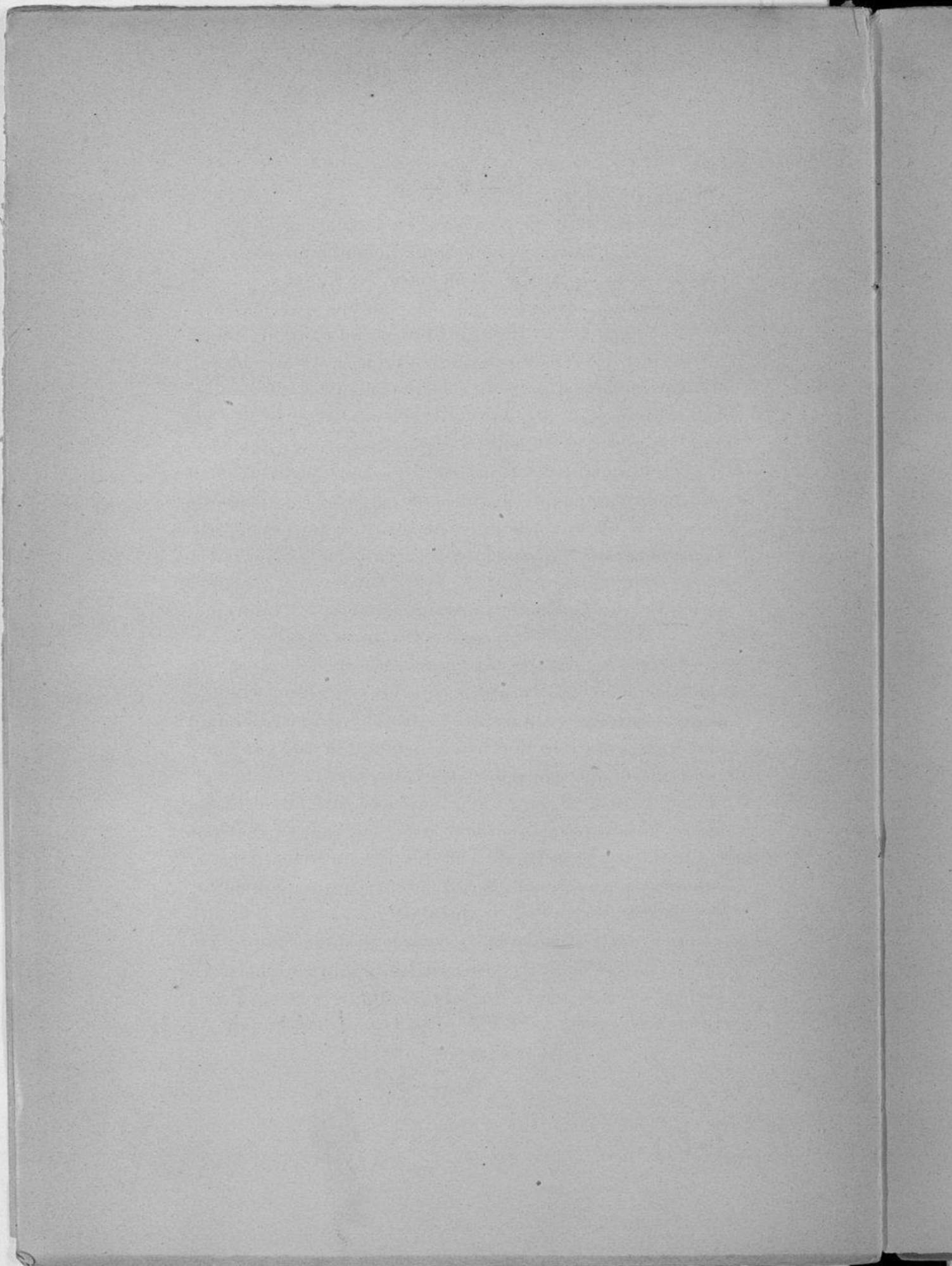
Comme potion calmante, on prescrira du bromure avec de la codéine, suivant l'âge.

Si l'accès est intense et présente la forme éclamptique, on aura recours en outre aux inhalations d'éther ou de chloroforme; on essaiera la compression des carotides.

Gastro-entérite. — La diète hydrique s'impose pendant un ou deux jours. On donnera à l'enfant ou de l'eau pure et bouillie, ou une eau minérale (Vals, Alet).

« La quantité d'eau doit remplacer, dit Marfan, la quantité de lait qu'on ne donne pas. » L'eau ne doit pas être administrée trop froide. On prescrira un purgatif léger, le calomel de préférence. En général ce traitement suffit.

Il n'est pas besoin de dire que dans tous les cas il faudra supprimer immédiatement la source d'intoxication. On modifiera le régime de la nourrice, au besoin on changera de nourrice; on écartera du biberon toute boisson alcoolisée, etc.



CONCLUSIONS

I. — A côté de l'alcoolisme aigu et de l'alcoolisme chronique classique, il existe une forme d'alcoolisme, l'alcoolisme latent, qui ne se révèle par aucun symptôme clinique, mais seulement par des signes dont les deux principaux sont : l'accoutumance et le besoin.

II. — L'alcoolisme fœtal est prouvé par l'observation clinique et par la physiologie expérimentale. Il a pour cause l'alcoolisme aigu, l'alcoolisme chronique ou l'alcoolisme latent des géniteurs. L'influence de l'alcool s'exerce soit à l'heure de la fécondation, soit au cours de la vie intra-utérine.

III. — L'alcool absorbé par une nourrice passe en nature dans son lait, quelle que soit la quantité ingérée. L'alcoolisme de la nourrice entraîne donc fatalement l'alcoolisme du nourrisson.

IV. — L'alcool est néfaste à l'enfant du premier âge dont il altère la santé et l'intelligence, même pour de faibles doses.

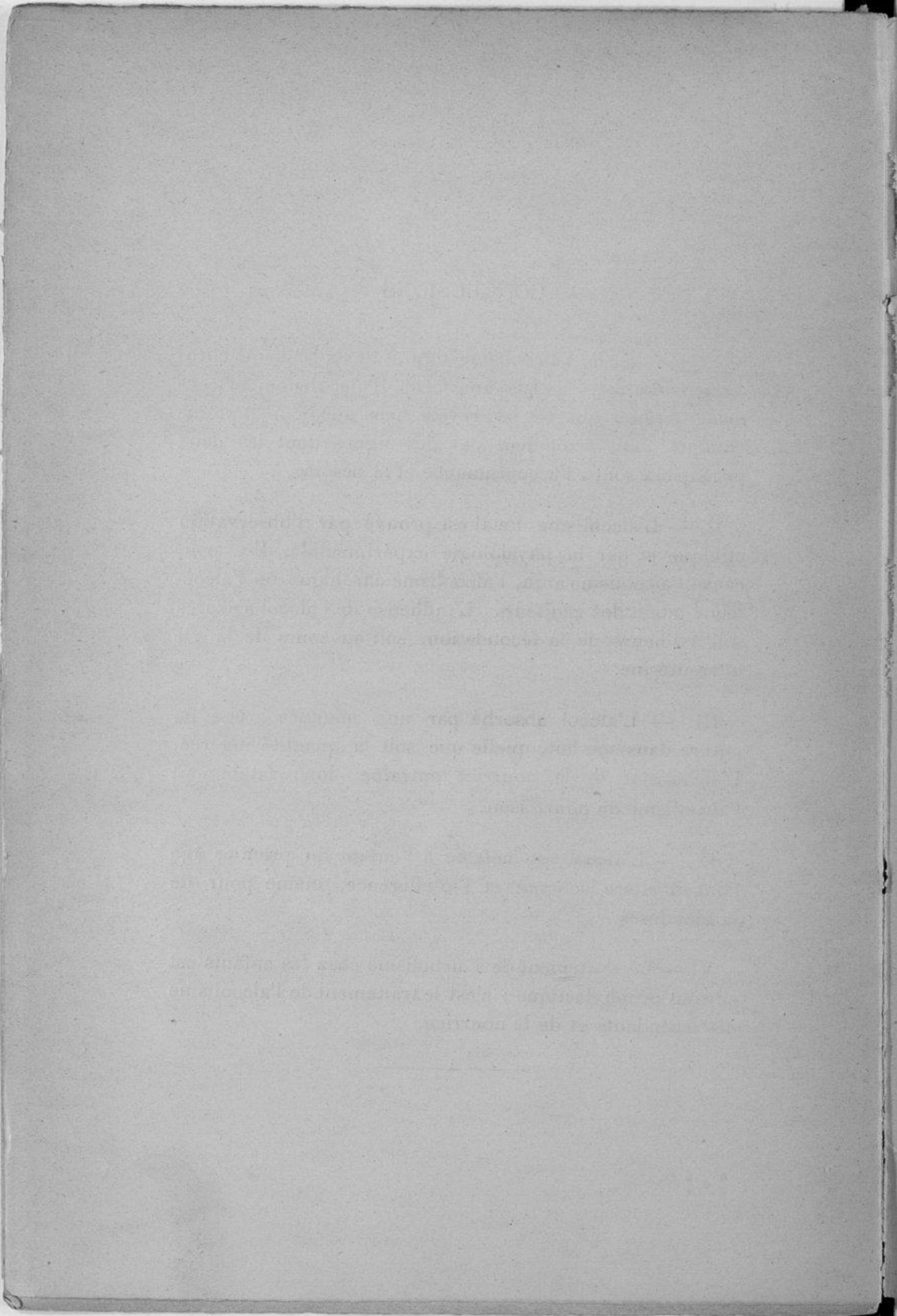
V. — Le traitement de l'alcoolisme chez les enfants est surtout prophylactique : c'est le traitement de l'alcoolisme des ascendants et de la nourrice.



INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- Aviat.** — *La question des établissements spéciaux pour la cure de l'alcoolisme.* Th. de Paris, 1900.
- Bidlot.** — *Le Scalpel*, août 1899.
— *Bulletins officiels de l'instruction primaire*, 1897.
- Charpentier.** — *Bulletin de la Société protectrice de l'enfance*, 1873.
- Debove.** — *Leçon d'ouverture du cours de Pathologie interne.*
- Glénard.** — De l'alcoolisme insidieux. *Progrès méd.*, fév. 1900.
- Guénard.** — *L'alcoolisme chez les enfants*, mai 1901.
- Jacquet.** — Le péril alcoolique en France. *Méd. moderne*, 8 fév. 1899.
- Jaquet.** — *L'alcoolisme.* Monographies cliniques.
- Lancereaux.** — Art. « Alcoolisme » du *Traité de médecine* BROUARDEL, GILBERT et GIRODE.
- Legrain.** — *Dégénérescence sociale et alcoolisme.* Paris, 1895.
- Meunier.** — *Journal de médecine et de chirurgie pratiques*, 25 avril 1898.
- Périer.** — *Annales de médecine et de chirurgie infantiles*, 1898.
- Rodiet.** — *L'alcoolisme chez les enfants.* Th. de Paris, 1897.
- Ruyssen.** — *L'enseignement médical de l'anti-alcoolisme.*
- Sapelier.** — *Notes inédites.*
- Simon (Paul).** — De l'accoutumance aux médicaments. *Journal de clinique et de thérapeutique infantiles*, août 1899.
- Toulouse.** — *Gazette des hôpitaux*, 1891.







IMPRIMERIE A.-G. LEMALE. — HAVRE

Liste des abréviations

- ❖ A1BG : Alpha-1B-glycoprotein
- ❖ ABC : ATP-binding cassette
- ❖ ACAA : Acetyl-CoA
Acyltransferase
- ❖ ACADSB : Acyl-CoA
Dehydrogenase Short/Branched
Chain
- ❖ ACSL : Long-chain-fatty-acid--
CoA ligase
- ❖ ADAM : short for a disintegrin
and metalloproteinase
- ❖ ADH : alcool déshydrogénase
- ❖ ADN : acide désoxyribonucléique
- ❖ ADRA : Adrenergic receptor
- ❖ AEBP : AE Binding Protein
- ❖ AFM : Afamin
- ❖ AhR : récepteur aux aryales
hydrocarbures
- ❖ AKT : protéine kinase B
- ❖ ALB : Albumine
- ❖ ALDH Acétaldéhyde
déshydrogénase
- ❖ ALDOB : Aldolase, Fructose-
Bisphosphate B
- ❖ ALOX5 : Arachidonate 5-
Lipoxygenase
- ❖ AMPc : adénosine
monophosphate cyclique
- ❖ APEH : Acylamino-acid-releasing
enzyme
- ❖ API : alcoolisations ponctuelles
importantes
- ❖ APO : Apoprotéines
- ❖ ARN : acide ribonucléique
- ❖ ARNm : acide ribonucléique
messenger
- ❖ ATP : Antipyrine
- ❖ ATP5MF : ATP Synthase
Membrane Subunit F
- ❖ AUH : AU RNA Binding
Methylglutaconyl-CoA Hydratase
- ❖ AVPR : Vasopressin receptors
- ❖ BAK1 : LRR receptor kinase
- ❖ BCAR1 : Breast cancer anti-
estrogen resistance protein 1
- ❖ BCRP : breast cancer resistance
protein
- ❖ BET1 : Bet1 Golgi Vesicular
Membrane Trafficking Protein
- ❖ BRS : Bombesin receptors
- ❖ CAPG : Macrophage-capping
protein
- ❖ CCKBR : Gastrin/cholecystokinin
receptors
- ❖ CD146: cluster of differentiation
146 ou MCAM (melanoma cell
adhesion molecule)
- ❖ CD31 : cluster of differentiation
31 ou PECAM-1 (Platelet
endothelial cell adhesion
molecule)
- ❖ CD44 : Cluster of differentiation
44 antigen
- ❖ CDH : Cadherin protein
- ❖ CDK : Cyclin Dependent Kinase
- ❖ CFL : Cofilin

- ❖ CHRM : Muscarinic acetylcholine receptors
- ❖ CHRNA : Neuronal acetylcholine receptors
- ❖ CIRC : centre international recherche et cancer
- ❖ CIZ1 : CDKN1A Interacting Zinc Finger Protein 1
- ❖ CK7 : cyto kératine 7
- ❖ CLEC14A : C-type lectin domain family 14 member A precursor
- ❖ CNR : GTP-binding nuclear protein receptors
- ❖ COG : Component Of Oligomeric Golgi Complex
- ❖ COL : collagen
- ❖ CRYAB : Alpha-crystallin B chain
- ❖ CRH/CRF : Corticotropin releasing hormone/ factor
- ❖ CRHp : CHR placentaire
- ❖ CTSB : Cathepsin B
- ❖ CTV : cytotrophoblastes vilieux
- ❖ CTEV : cytotrophoblastes extra vilieux
- ❖ CYP : cytochrome P
- ❖ DAPI: 4',6-diamidino-2-phénylindole
- ❖ DCN : Decorin
- ❖ DDT : D-dopachrome decarboxylase
- ❖ DL: Date limite
- ❖ DPBS: Dulbecco's Phosphate Buffered
- ❖ DGKZ : Diacylglycerol kinase zeta
- ❖ DRD : Dopamine receptor
- ❖ DSK : desmoplakine
- ❖ EGF : endothelial growth factor
- ❖ EIF : Eukaryotic translation initiation factor
- ❖ ENPEP : Aminopeptidase A
- ❖ EPA : exposition prénatale à l'alcool
- ❖ ERO / ROS : espèces réactives à l'oxygène
- ❖ EtOH : Ethanol
- ❖ FABP4 : Fatty acid-binding protein 4
- ❖ FAS : t umor necrosis factor receptor superfamily member
- ❖ FBP Fructose-1,6-bisphosphatase
- ❖ FC : fold change
- ❖ FDFT1 : Squalene synthase
- ❖ FGB : Fibrinogen beta chain
- ❖ FLT1 : fms-like tyrosine kinase 1 (VEGFR1)
- ❖ FTH : Ferritin heavy chain
- ❖ GABA : Gamma-aminobutyric acid
- ❖ GABBR : Gamma-aminobutyric acid receptor
- ❖ GC : Vitamine D binding protein
- ❖ GCM1 : glial cell missing 1
- ❖ GHRH: Growth hormone-releasing hormone
- ❖ GOSR : Golgi SNAP Receptor Complex Member

- ❖ GPD : Glycerol-3-phosphate dehydrogenase
- ❖ GRB : Growth factor receptor-bound protein
- ❖ GRIA : Glutamate Ionotropic Receptor AMPA Type
- ❖ GRIK : Glutamate receptor, ionotropic, kainate
- ❖ GRIN : Glutamate receptor ionotropic, NMDA precursor
- ❖ GRM : Glutamate Metabotropic Receptor
- ❖ GRPR : Gastrin-releasing peptide receptors
- ❖ GSK : Glycogen Synthase Kinase
- ❖ GSTO : Glutathione S-transferase omega
- ❖ GTD : gestational trophoblast disease
- ❖ HBD : Hemoglobin Subunit Delta
- ❖ HBE1 : Hemoglobin Subunit Epsilon 1
- ❖ HBSS : Hank's Balanced Salt Solution
- ❖ HBZ : HTLV-1 bZIP factor
- ❖ hCG : Gonadotrophine Chorionique humaine
- ❖ HCRT : Hypocretin Neuropeptide Precursor
- ❖ HCK : Tyrosine-protein kinase
- ❖ HRH : Histamine H receptor
- ❖ HDL : lipoprotéines de haute densité
- ❖ HIF : hypoxia inductible transcription factor
- ❖ HLA-DRA : Major Histocompatibility Complex, Class II, DR Alpha
- ❖ HPX : Hemopexin
- ❖ HSD11B1 : Hydroxy-delta-5-Steroid Dehydrogenase, 3 beta-and Steroid delta-Isomerase 1
- ❖ HTR : Serotonin Receptor
- ❖ HTT : Huntingtin
- ❖ IC : indice de confiance
- ❖ IF : index de fusion
- ❖ IGFALS : Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit
- ❖ IL : interleukine
- ❖ INSEE : Institut national de la statistique et des études économiques
- ❖ INSERM : Institut national de la santé et de la recherche médicale
- ❖ IRF : Interferon regulatory factor
- ❖ IRM : imagerie par résonance magnétique
- ❖ ITGA : Integrin Subunit Alpha
- ❖ IVG : interruption volontaire de grossesse
- ❖ LAMTOR : ate endosomal/lysosomal adaptor and MAPK and mTOR activator
- ❖ LBP : Lipopolysaccharide Binding Protein

- ❖ LCP : latex-clearing protein
- ❖ LDH : Lactate déhydrogénase
- ❖ LDL : Lipoprotéine de faible densité
- ❖ LPIN : Lipin
- ❖ LSM : Sm-like protein
- ❖ LXR : Liver X receptor
- ❖ MAPK : Mitogen-activated protein Kinase
- ❖ MARK : Microtubule Affinity Regulating Kinase 2
- ❖ MEOS : Microsomial Ethanol Oxydizing System
- ❖ MLN64 : Metastatic Lymph Node 64
- ❖ MLST8 : Target of rapamycin complex subunit LST8
- ❖ mTOR : mammalian target of rapamycin
- ❖ NAD⁺: Nicotinamide adenine dinucleotide
- ❖ NADPH : Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
- ❖ NDUF : NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein
- ❖ NEBL : Nebulette
- ❖ NMDA : acide N-méthyl-D-aspartique
- ❖ NOL : Nucleolar protein
- ❖ NPY : Neuropeptides Y
- ❖ NTSR : Neurotensine receptor
- ❖ NUP : Nucléoporines
- ❖ NS : non significatif
- ❖ OMS : organisation mondiale de la santé
- ❖ OXTR : Oxytocin receptor
- ❖ P4HA2 : Prolyl 4-Hydroxylase Subunit Alpha 2
- ❖ PAG : petit poids d'âge gestationnel
- ❖ PARP : poly(ADP-ribose) polymérase
- ❖ PCA : analyse en composantes principales
- ❖ PCR : Polymerase Chain Reaction
- ❖ PDPK1 : 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1
- ❖ PEGAM
- ❖ PEPD : Peptidase D
- ❖ PFA : paraformaldéhyde
- ❖ PFAS :Phosphoribosylformylglycinamide synthase
- ❖ PGAM : Serine/threonine-protein phosphatase
- ❖ PG : progesterone
- ❖ PGRMC2 : Progesterone Receptor Membrane Component 2
- ❖ PIB : produit intérieur brut
- ❖ PI3K : phospho-inositol 3-kinase
- ❖ PIP2 : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
- ❖ PIP3 : Phosphoinositol (1,4,5)-trisphosphate
- ❖ PKA : protéine kinase A
- ❖ PLC : Phospholipase C
- ❖ PLD3 : 5'-3' exonuclease PLD3

- ❖ PlGF : facteur de croissance placentaire
- ❖ PON : Serum paraoxonase/ arylesterase
- ❖ PPAR : Peroxisome Proliferator Activated Receptor
- ❖ PPP2R5E : Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit epsilon isoform
- ❖ PROX : Prokineticin receptor
- ❖ PTEN : Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase PTEN
- ❖ POMC : pro-opiomélanocorine
- ❖ QI : quotient intellectuel
- ❖ RAB : Ras-related protein Rab
- ❖ RBP : Retinol-binding protein
- ❖ RCIU : retards de croissance intra-utérin
- ❖ REL : EL Proto-Oncogene, NF-KB Subunit
- ❖ RICTOR : Rapamycin-insensitive companion of mTOR
- ❖ ROS : Reactiv oxygen species (=ERO (fr))
- ❖ RPL : Ribosomal Protein L
- ❖ RPM: Rotation par minute
- ❖ RPS6KA5 : Ribosomal protein S6 kinase alpha 5
- ❖ RTK : Receptor tyrosine kinases
- ❖ RXR : Retinoïd X receptor
- ❖ SA : semaine d'aménorrhée
- ❖ SAF : syndrome d'alcoolisme foetal
- ❖ SAP : syndrome d'alcoolisme placentaire
- ❖ SCTR : secretin receptor
- ❖ SEC22 : Vesicle Trafficking Protein
- ❖ SERPIN : serpin family
- ❖ SFXN1 : sidéroxiflexine-1
- ❖ SHBG : Sex Hormone-Binding Globulin
- ❖ SLC : solute carriers
- ❖ SNC : système nerveux central
- ❖ SSTR : Somatostatin receptor
- ❖ ST : syncytiotrophoblastes
- ❖ STAT3 : Signal transducer and activator of transcription 3
- ❖ STAT5A : Signal transducer and activator of transcription 5A
- ❖ SVF : serum de veau foetal
- ❖ SYNC1 : Syncytine 1 HERV-W1
- ❖ SYNC2 : Syncytine 2 HERV-W2
- ❖ TACR : Tachykinin neuropeptide substance P receptor
- ❖ TAP : Antigen peptide transporteur
- ❖ TBP-2 : TATA-binding protein 2
- ❖ TCAF : troubles causés par l'alcoolisme foetal
- ❖ TDAH : troubles de déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité

- ❖ TF : transferrine
- ❖ TGF : transforming growth factor
- ❖ THBS : thrombospondine
- ❖ THOP : Thimet Oligopeptidase
- ❖ TIMM9 : Translocase of Inner Mitochondrial Membrane 9 Homolog
- ❖ TPI1 : Triosephosphate isomerase
- ❖ TSC1 : Hamartin
- ❖ TSC2 : Tuberin
- ❖ TSPO : protoporphyrin receptors
- ❖ TTF : taux de transfert fœtal
- ❖ VAMP8 : vesicle Associated Membrane Protein 8
- ❖ VEGF: vascular endothelial growth factor
- ❖ VEGFR: vascular endothelial growth factor receptor
- ❖ VLDL: lipoprotéines de très faible densité
- ❖ WB : Western Blot

Introduction

Alcool, santé publique et métabolisme

Responsable de plus de 5% de la charge de morbidité mondiale (WHO, 2018) et avec un coût économique de 1% du PIB mondial (J. Rehm et al. 2009) il est estimé que 283 millions de personnes souffrent de troubles liés à la consommation d'alcool. En ce qui concerne le territoire français, 49 000 décès causés par l'alcool en 2016 étaient recensés avec un taux d'alcoolisation qui ne cesse d'augmenter et un coût économique estimé à 118 milliards d'euros (Inserm 2021).

En matière de consommation régulière, en France en 2014, 40% de la population, entre 18 et 25ans déclaraient consommer de l'alcool de manière hebdomadaire dont 12% sont des femmes (ce qui représente un peu plus de 30% de la population féminine de cette tranche d'âge) (Richard et al. 2014 ; INPES 2015). Si l'on extrapole avec les chiffres de l'INSEE en 2019, en France, la tranche d'âge correspondante représente 3 020 305 femmes soit plus de 906 091 jeunes femmes qui auraient consommé de l'alcool chaque semaine en 2019. Ce chiffre est certainement sous-estimé puisque l'on observe une consommation d'alcool par les femmes en constante augmentation depuis 2005. De plus, un rapport récent de l'O.C.D.E. (Organisation de coopération et de développement économiques, 2021) montre qu'au cours des périodes de confinement, dues à la covid 19, les femmes, les parents de jeunes enfants et les personnes en situation de détresse psychologique ont fortement augmenté leur consommation d'alcool en France (ceci est également observé en Belgique, en Australie, aux États-Unis et au Royaume-Uni).

En termes d'habitude de consommation chez l'adulte de plus de 18ans, le vin et la bière (24% et 27% respectivement) sont les plus consommés de façon hebdomadaire (Inserm 2021). Il a été également montré une augmentation de la consommation d'alcool forts associée à des boissons énergisantes dans différents pays industriels. Ces consommations sont particulièrement à risque car, outre la toxicité des boissons énergisantes en elles-mêmes sur la santé (Wolk B.J. et al 2012), l'association de ces dernières avec l'alcool réduit l'effet soporifique de l'alcool et atténue son gout, poussant ainsi les jeunes adultes à augmenter leur consommation jusqu'à l'état d'ébriété (Tarragon E. et al, 2020).

Outre ces données générales, de plus en plus de jeunes adultes ont des pratiques de consommation qui sont à risques et qui augmentent très largement les taux de morbidité liés à l'alcool. Dans les pratiques apparues depuis près de 10 ans, celle du « binge-drinking

» est plébiscitée ; elle consiste à boire en moins de 2h l'équivalent de 5 verres ou plus chez l'homme (4 chez la femme), engendrant ainsi une concentration d'alcool dans le sang égale ou supérieure à 0.8% (seuil d'intoxication défini par l'OMS) pour les « bingers » modérés et qui peut aller jusqu'à 2g/L et plus dans les cas les plus sévères. Chez les jeunes femmes entre 18 et 25ans, ces pratiques d'alcoolisations ponctuelles importantes (API) sont en hausse. Passées de 11% en 2005 à 28% en 2014, les API mensuelles des Françaises touchent majoritairement le milieu du secondaire et de l'enseignement supérieur.

Une forme plus récente de cette pratique est la « neknomination » qui prend place sur les réseaux sociaux et qui incite les protagonistes à la consommation excessive d'alcool « cul-sec » *via* l'intermédiaire de défis. Ces pratiques, extrêmement dangereuses témoignent d'une mise en danger populaire chez les jeunes adultes qui ne cessent de vouloir dépasser des limites.

De plus, la visibilité de ces comportements, favorisée par les réseaux sociaux, poussent un peu plus les jeunes adultes à la multi-consommation (G.G. Groth et al. 2017). En effet, même si l'alcool et le tabac restent les substances les plus consommées en termes d'usage régulier (pour 8.7 millions de Français.e.s et 13.3 millions, respectivement), la consommation de substances illicites augmente avec près d'1.5 millions d'usagers réguliers de cannabis (dont 6.8% sont des femmes) et 450 000 personnes qui déclarent avoir consommé de la cocaïne au cours de l'année 2014 (Baromètre Santé 2014 (Inpes), Escapad 2014 (OFDT), ESPAD 2011 (OFDT), HBSC 2014 (Rectorat de Toulouse))(Tableau 1 modifié d'après celui du Haut Conseil de la santé publique, 2016).

Sans surprise les enjeux sanitaires divers, liés à ces multi-consommations ont mené à de nombreuses campagnes de prévention. Au cours des années, l'alcool a souvent été sujet à conflit entre les habitudes sociétales et les données scientifiques et médicales. Déjà au centre des préoccupations mondiales en 1852, le Dr Huss décrivait, avant toute guerre mondiale, l'alcool comme « *un fléau plus redoutable que les guerres ou les épidémies les plus meurtrières* » (Ladrague P, 1901). Il y a quelques décennies, la consommation de vin, pour combattre ou prévenir de certaines pathologies ou encore pour améliorer la condition morale et physique des Français, restait encouragée (Lalouette J., 1980). Bien que de nos jours les différents acteurs de la santé publique soient conscients des risques inhérents à ces consommations, les obstacles restent nombreux : accessibilité facilitée aux différentes

substances, attractivité *via* les réseaux et la publicité, sensibilisation trop légère, détection précoce difficile de certains comportements à risques.

Tableau 1 Estimation du nombre de consommateurs de substances psychoactives en France métropolitaine d'après le tableau du Haut Conseil de la Santé Publique, adsp n°95 (2016)

	Alcool	Tabac	Cannabis	Cocaïne
Expérimentateurs entre 11-75 ans	46,9 M	38,2M	17,0 M	2,2 M
- Dont usagers dans l'année	42,8 M	16,0M	4,6M	450 000
- Dont usagers réguliers	8,7M	13,3M	1,4M	//

// : non disponible car la méthode d'enquête ne permet pas une telle estimation.

Définitions :

Expérimentation : au moins un usage au cours de la vie (cet indicateur sert principalement à mesurer la diffusion d'un produit dans la population)

Usage dans l'année : consommation au moins une fois au cours de l'année ; pour le tabac, cela inclut les personnes déclarant fumer actuellement, ne serait-ce sur de temps en temps.

Usage régulier : au moins trois consommations d'alcool dans la semaine ; tabac quotidien ; et consommation de cannabis d'au moins 10 fois au cours du mois.

NB : la population française âgée de 11-75ans est d'environ 50 millions. Ces chiffres sont des ordres de grandeur, dans la mesure où une marge d'erreur existe, même si elle s'avère raisonnable. Par exemple 17 millions d'expérimentateurs de cannabis signifie que le nombre se situe vraisemblablement entre 16 et 18 millions. Sources : Baromètre Santé 2014 (INPES), Escapad 2014 (OFDT), ESPAD 2011 (OFDT), HBSC 2014 (Rectorat de Toulouse).

Absorption, métabolisme et élimination de l'alcool par l'organisme adulte :

L'alcool, absorbé per os va séjourner dans l'estomac pour un temps variable, selon la concentration en alcool ingérée, la prise ou non d'aliments associée et la co-exposition à d'autres substances. Cette absorption digestive se fait par diffusion passive, lente, dès le niveau buccal et jusqu'au niveau gastrique. Au cours de ce séjour intragastrique, une fraction de cet alcool va être métabolisé en acétaldéhyde par une alcool-déshydrogénase (ADH) gastrique, contenue directement dans la muqueuse gastrique (60% moins abondante chez la femme que chez l'homme) (Paquot NS. 2019). Au niveau de l'intestin grêle, 70 à 80% de l'alcool va être absorbé passivement, empruntant la veine porte vers le foie, siège principal de son métabolisme. La capacité de l'alcool à diffuser dans l'organisme, proche de l'eau, est respectivement de l'ordre de 70 et 60 % du poids corporel chez les hommes et chez les femmes. Plus un organe est vascularisé, plus l'éthanol va diffuser rapidement et l'imbiber. Ainsi, très rapidement les concentrations d'alcool dans le cerveau, les poumons et le foie sont retrouvées égale à celle de la circulation sanguine (INSERM rapport 2001).

Les différences sexuelles d'absorption, de métabolisation et d'élimination (et même d'addiction à l'alcool) sont partiellement expliquées par la concentration d'ADH gastrique mais également par les différences d'assimilation des repas (dans le cas de prises de nourriture concomitante) et par les concentrations d'œstradiol et de progestérone chez la femme (Ho A. M-C. et al, 2019).

Le métabolisme de l'alcool conduit systématiquement à un stockage - plus ou moins important - des triglycérides intra-hépatocytaires. Pour le reste, il conduit à une production de chaleur. N'ayant aucune valeur nutritive brute, le corps humain va chercher à éliminer l'alcool selon 2 processus différents. Le premier ne concerne que 2 à 10% de la

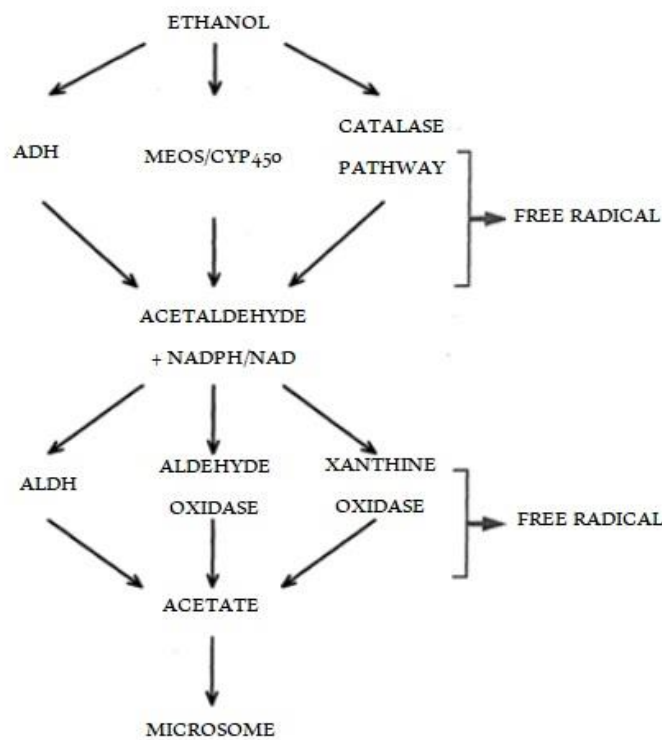


Figure 1 Voie métabolique de l'alcool modifiée d'après V. Laforest Bérard, 1995

quantité ingérée, qui sera soumise à une élimination urinaire, alvéolaire, cutanée ou salivaire. Les 90 à 98% restant seront ainsi métabolisés en acétaldéhyde, principalement au niveau hépatique. Cette oxydation de l'éthanol peut être médiée par 3 voies (Figure 1).

- 1) La voie principale est celle qui met en jeu l'alcool déshydrogénase hépatique (ADH) dont il existe plusieurs formes codées par des variantes génétiques.

- 2) La seconde voie est contrôlée par le MEOS (Microsomial Ethanol Oxydizing System), système complexe qui met en jeu une oxydation microsomale de l'éthanol par, entre autres, les cytochromes P450 et qui produit des radicaux libres très toxiques (esters éthyliques d'acides gras et de phosphatidyléthanol). Ce système est inductible, en particulier dans les cas d'alcoolisation chronique ou d'épisodes d'alcoolisation trop importants, saturant la voie principale de l'ADH
- 3) La dernière voie est celle de la catalase, qui reste accessoire.

L'acétaldéhyde, produit de la métabolisation de l'éthanol, est un métabolite très toxique que l'organisme va chercher à éliminer à son tour. Ainsi, 90% de l'acétaldéhyde sera oxydé en acétate par l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH), correspondant à l'étape de détoxification. L'acétate produit va pouvoir être catabolisé par une Acétyl-CoA synthétase (ACS) en Acétyl-CoA jouant un rôle clé dans le métabolisme cellulaire (C.S. Lieber. 2005) puisque cette molécule pourra soit produire de l'énergie *via* le cycle de Krebs, soit permettre la synthèse d'acide gras ou de cholestérol, ou encore être transformée en acétoacétate selon les besoins de l'organisme. L'alcool est ainsi métabolisé (7,1 kcal/g). Cette étape de détoxification est à mettre en miroir avec les concentrations d'alcool dans l'air expiré, mesurées par éthylotest.

En effet, ces tests montrent une concentration maximale d'alcool dans le sang (pour un adulte) 30 minutes après une consommation d'alcool et disparaît de l'haleine entièrement au bout de 5 heures (M. Mackus et al. 2000) (Figure 2). En réalité l'étape de détoxification dans le sang peut prendre de 8 à 12 heures.

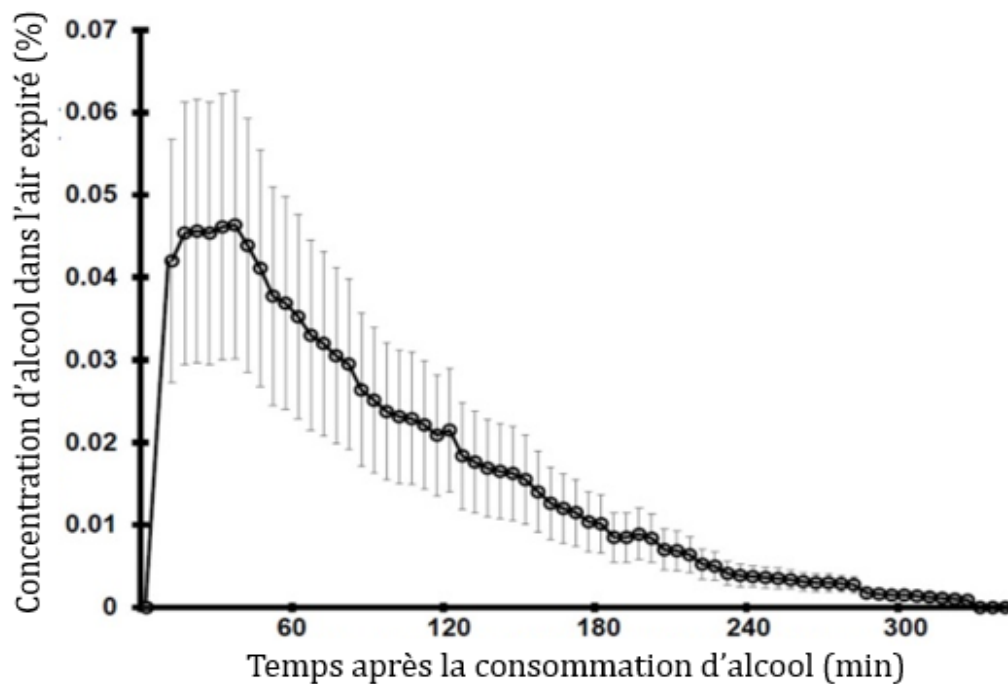


Figure 2 Concentration d'alcool dans l'haleine. D'après la figure de M. Mackus et al. 2000. (L'écart type (SE) des différentes concentrations est montrée.)

Mécanisme de toxicité de l'alcool

Malgré ces données sur l'absorption et la métabolisation de l'alcool dans le corps humain, sa consommation, socialement acceptée, peut être particulièrement toxique pour le corps humain.

La toxicité de l'alcool, en partie imputée à son métabolite, l'acétaldéhyde, touche tous les organes perméables et hautement vascularisés (en particulier le foie et le cerveau). De nombreux travaux ont étudié la toxicité de l'acétaldéhyde au niveau des différents organes. Notamment une étude de 1995 sur un modèle murin a permis de démontrer la mutagénicité de ce métabolite et l'induction de ces lésions à l'ADN même dans le cas d'alcoolisation modérée (Fang J.L., Vaca C.E. 1995). De plus cette étude a permis de mettre au point un protocole de quantification de ces adduits à l'ADN produits par l'acétaldéhyde (Balbo S., Hecht S.S. 2014). Cette toxicité lésionnelle de l'acétaldéhyde a été retrouvée dans le cadre des études menées sur l'effet de l'alcool au niveau du système nerveux central adulte.

Lorsque l'on parle de la toxicité de l'alcool, c'est souvent *via* son métabolite qu'elle est étudiée ; pourtant l'alcool non métabolisé en acétaldéhyde n'est pas en reste. Classé

comme cancérigène, tératogène et reprotoxique par le CIRC il y a plus de trente ans, l'éthanol est impliqué dans différentes perturbations des voies de signalisation cellulaires.

Plusieurs auteurs s'accordent à dire que le facteur pathogénique principal de l'alcool résulte de la production d'espèces réactive de l'oxygène (ERO) *via* le métabolisme cellulaire induisant un stress oxydant toxique pour les cellules (Inserm 2001). Les ERO les plus retrouvées dans le cas d'une alcoolisation aiguë sont le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'anion superoxyde (O_2^-) et le radical hydroxyde ($\cdot OH$) (Sergent O, Griffon B., Cillard P. et Cillard J. 2001). Ces espèces sont majoritairement produites au niveau hépatique, surtout au niveau des cellules de Küpffer. Elles vont être produites lors de la métabolisation de l'alcool par le MEOS (Microsomial Ethanol Oxydizing System), par des enzymes cytosoliques ou par la chaîne respiratoire mitochondriale. Dans le système microsomal, l'oxydation de l'éthanol se fait majoritairement par les cytochromes P450 (CYP P450), et notamment le CYP2E1 et CYP2E2. Lors de l'activation de ces cytochromes, d'autres dérivés toxiques vont être produits et certaines voies de détoxification vont être activées (notamment la voie du récepteur aux Aryles hydrocarbures, AhR, qui elle-même peut induire la production de métabolites toxiques pour la cellule). Indépendamment de l'acétaldéhyde déshydrogénase, le système microsomal est inductible par l'éthanol.

Tous ces mécanismes rendent l'alcool responsable d'une soixantaine d'affections chroniques : parmi ces pathologies on retrouve des cancers (8% des nouveaux cas de cancer sont dûs à l'alcool), le diabète, la cirrhose du foie et d'autres pathologies hépatiques, des atteintes neuropsychiatriques et des maladies cardiovasculaires (INSERM 2001, Rhem J. et al, 2009).

Les complications dues à une consommation chronique ou aiguë répétée de l'alcool induisent chez les sujets des troubles neurologiques persistants (polyneuropathies, syndrome cérébelleux, encéphalopathie) (INSERM 2001). Dans le cas d'alcoolisme chronique, des anomalies anatomiques cérébrales peuvent apparaître (pertes neuronales, réduction de la taille du cervelet, des corps calleux et du volume de la matière blanche).

De manière plus ponctuelle (uniquement le temps de l'alcoolémie), il existe une toxicité aiguë fonctionnelle de l'alcool sur le système nerveux central. Au-delà des comportements violents et autres troubles cognitifs, les conséquences de cet évènement ponctuel peuvent être bien plus grave voir définitives (accident, mort).

Ces informations acquises au fil des ans démontrent à quel point la prévention est nécessaire sur les dangers de l'alcool. Plus encore, cette prévention est indispensable pour les adolescents et les populations en âge de procréer.

Alcool et grossesse : santé publique et généralités

En termes de prévention, depuis 2007, toutes les boissons contenant de l'alcool doivent porter un pictogramme associé à un message sanitaire déconseillant l'usage au cours de la grossesse. La prévention, basée sur un pictogramme affiché sur les bouteilles, n'est pas suffisante et la tolérance zéro doit être recommandée par tous les professionnels de santé. Malgré cela, la consommation d'alcool au cours de la grossesse est loin d'être un cas isolé et les raisons sont multiples : consommation consciente compulsive (alcoolisme), grossesse involontaire non connue au jour de la consommation (grossesse spontanée non souhaitée ou imprévue, dénis de grossesse), consommation épisodique et/ou festive. En pratique une femme sur huit déclare avoir consommé de l'alcool au cours de la grossesse (Floyd R.L et Sidhu J S. 2004). Selon le rapport de 2004 du MMWR (morbidity and mortality weekly report centers for Disease control and prevention (CDC)), 12.5% des femmes enceintes déclarent avoir consommé de l'alcool au cours de la grossesse, parfois sans savoir qu'elles étaient enceintes et environ 2% estiment avoir pratiqué le binge-drinking au cours de cette période. Ces pourcentages reposant sur les déclarations, nous pouvons estimer que la consommation d'alcool pendant la grossesse est encore plus élevée. Sur le territoire français, d'après une étude de l'INSERM, 20% des femmes interrogées indiquaient avoir consommé de l'alcool au cours de leur grossesse et 2.5% avait bu 3 verres ou plus pour une même occasion. En début de grossesse (avant la découverte de l'état gestationnel) 8% des femmes indiquaient avoir eu, au moins une fois, une consommation en binge-drinking (INSERM 2020). Pour autant, les mécanismes de toxicité de l'alcool au cours de la grossesse sont largement sous étudiés.

Comme décrit précédemment, l'alcool une fois ingéré va être absorbé et va passer dans la circulation sanguine avant d'être distribué aux organes vascularisés et y être stockés le temps de son élimination ou de sa métabolisation. Lors de la grossesse, l'alcool va rapidement atteindre la circulation utero-placentaire et traverser le placenta, organe très vascularisé. Dans la circulation fœtale, l'alcool va être distribué au fœtus en premier lieu par le cordon ombilical puis par le liquide amniotique, pouvant ensuite être de nouveau distribué par la circulation fœtale pour atteindre l'ensemble des organes en

développement. Ainsi on estime la concentration d'alcool dans le liquide amniotique et le sang fœtal égale à celle de la mère seulement 1 à 2 heures après l'ingestion (Idanpaan-Heikkila et al., 1972). A l'inverse de la femme, le fœtus, ayant un foie immature, va difficilement métaboliser l'alcool et sera donc exposé plus longuement à l'alcool *in utero* (Paquot N.S. 2019). De surcroît, l'alcool éliminé par le fœtus dans ses urines sera directement déversé dans le liquide amniotique (lui-même ayant déjà sa concentration d'alcool équivalente à celle de la femme) dans lequel il est immergé. Ce circuit fermé montre à quel point l'alcool va être métabolisé et éliminé beaucoup plus lentement chez le fœtus que dans le sang maternel.

Cette exposition prolongée permet d'expliquer les risques et conséquences multiples sur le fœtus. Selon une revue de Pruett, Hubbard Waterman et Caughey, plusieurs études ont décrit un risque de mort fœtale *in utero* après 22 semaines d'aménorrhée 2 fois supérieur (IC 95%) pour des femmes ayant consommé un minimum de 3 verres par semaine par rapport aux femmes n'ayant pas consommé d'alcool (Pruett D. Hubbard Waterman E. et Caughey A.B. 2013). Cependant lorsque la consommation d'alcool au cours de la grossesse n'est pas fatale, elle peut tout de même conduire à des impacts plus ou moins graves sur le déroulement de la grossesse et/ou sur le développement du fœtus (développement prénatal, développement post-natal avec des conséquences à court, moyen ou long terme). L'effet toxique de l'alcool au cours de la grossesse est important et bien connu : depuis plus de 30ans l'alcool est décrit comme une substance tératogène en période embryonnaire et/ou neurotoxique tout au long de la gestation (pour l'embryon ou le fœtus). Le terme tératogène (malformatif au sens classique – teratos = monstre) n'est pas dénué de sens et a un impact très fort chez les jeunes femmes qui ont un désir de grossesse. Malgré ce terme, la situation reste paradoxale avec les comportements face à l'alcool.

Pour comprendre les enjeux de l'alcoolisation au cours de la grossesse, il est important de décrire en premier lieu les différentes étapes et les principales modifications physiologiques de la grossesse.

Grossesse physiologique

Selon sa définition, la grossesse est « l'ensemble des phénomènes se déroulant entre la fécondation et l'accouchement, durant lesquels l'embryon, puis le fœtus, se développe dans l'utérus maternel ».

L'embryogenèse est le processus de développement de l'embryon humain depuis la fécondation jusqu'à la 3e semaine de développement. A la suite de la fécondation, l'amas cellulaire issu de la fécondation d'un ovule par un spermatozoïde, aussi appelé zygote, va se diviser et devenir le blastocyste. Cette période permet la fixation, l'implantation progressive du blastocyste jusqu'à son enfouissement dans la muqueuse utérine. Cet amas cellulaire va se déplacer de la trompe jusqu'à la cavité utérine et s'y implanter afin de permettre, notamment, le développement du placenta, organe indispensable au maintien de la grossesse et au développement du fœtus. Au cours de la deuxième semaine,

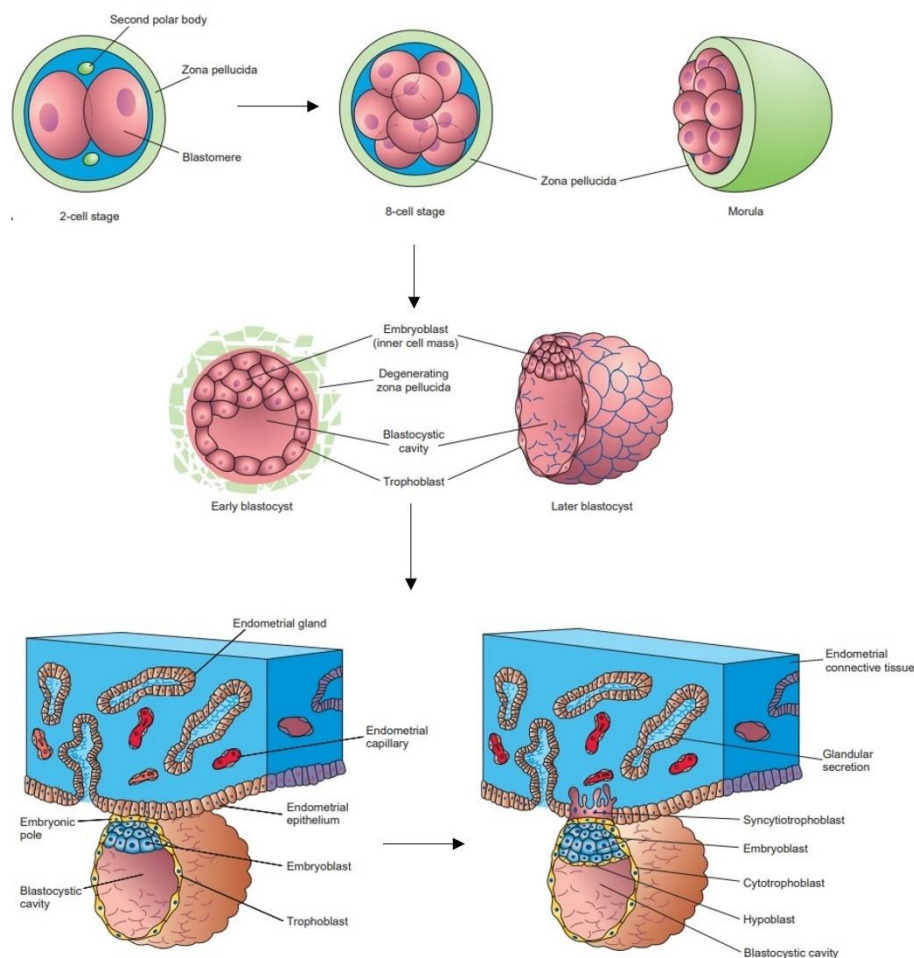


Figure 3 Représentation schématique de la formation du blastocyste et son attachement à la muqueuse utérine. Le zygote va se diviser progressivement pour former le blastocyste (à J5) puis s'attacher à l'endomètre à partir de J6 par son pôle embryonnaire (illustration en bas à gauche). Au 7^e jours le syncytiotrophoblaste pénètre l'endomètre maternel pour s'y enfouir. Modifié d'après "The developing human: clinically oriented embryology" par Moore K.L., Persaud T.V.N, Torchia M.G. (Edition originale 2016)

le blastocyste va progressivement laisser la place au disque embryonnaire. D'un côté du disque la vésicule vitelline formera le tractus digestif, de l'autre l'amnios laisse place à la cavité amniotique dans lequel baignera l'embryon puis le fœtus jusqu'à terme (Figure 3). Au cours de cette période, différents facteurs vont permettre la mise en place du cordon ombilical, des différents vaisseaux et l'angiogenèse placentaire.

La période embryonnaire commence à partir de la troisième semaine de développement.

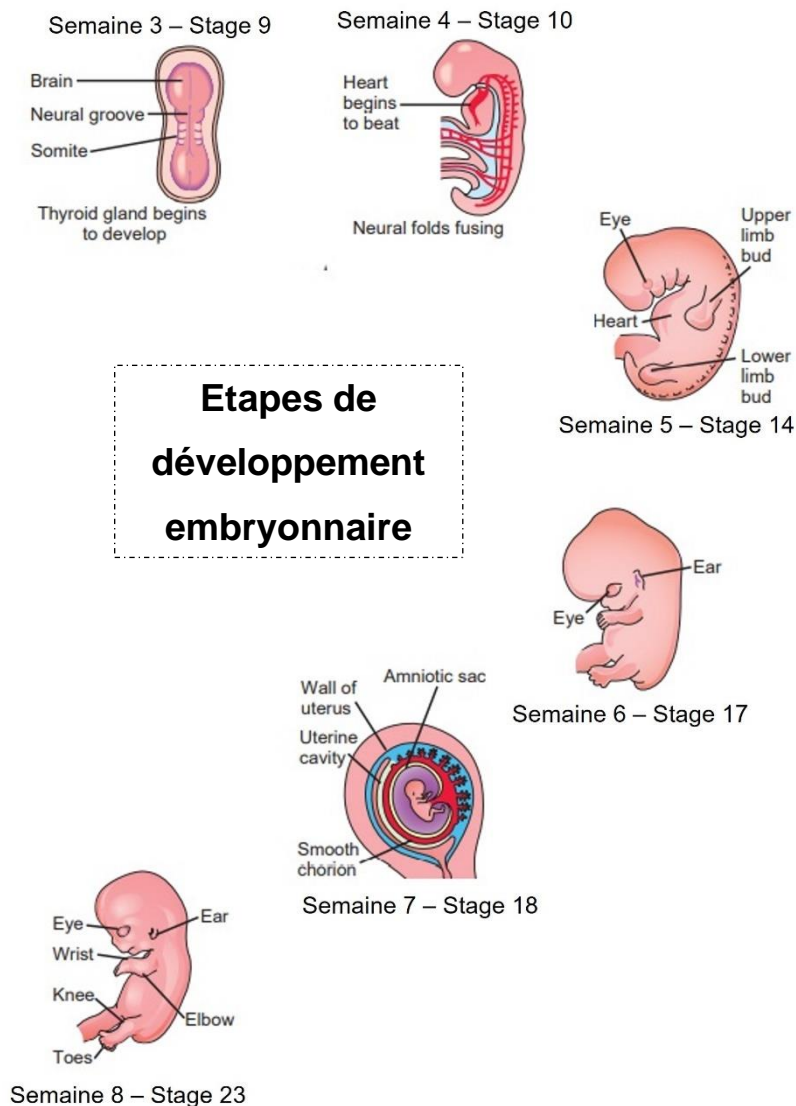


Figure 4 Etapes de développement de la période embryonnaire. De la 3^e semaine jusqu'à la 8^e semaine. Modifié d'après « The developing human: clinically oriented embryology » par Moore K.L., Persaud T.V.N, Torchia M.G. (Edition originale 2016)

Cette période permet la gastrulation, la neurulation, et marque le début de l'organogenèse (Figure 4). Le premier évènement de la gastrulation est la mise en place de la ligne primitive (symétrie bilatérale de l'embryon) et des trois feuillets embryonnaires (endoderme, mésoderme, ectoderme). C'est le point de départ d'une organogenèse régulée, délimitée dans l'espace et symétrique. A ce moment, les annexes extra

embryonnaires évoluent et notamment les cellules du trophoctoderme se différencient pour former l'ensemble des cellules trophoblastiques (tissu placentaire d'origine embryonnaire) qui va permettre, entre autres, les échanges entre la mère et le fœtus tout au long de la grossesse. A partir de la onzième semaine d'aménorrhée, l'embryon va laisser la place au fœtus. Cette période fœtale permet le développement et la croissance du fœtus jusqu'au terme de la grossesse. Intimement dépendant de la phase embryonnaire, un développement fœtal défectueux peut conduire à différentes malformations. Les facteurs exogènes en début de grossesse tel que l'alcool, les drogues, le tabac, peuvent affecter le développement à long terme de l'individu.

La grossesse physiologique, considérée comme une greffe semi-allogène, va nécessiter de nombreuses modifications morphologiques, métaboliques et hormonales chez la femme. La première étape d'une grossesse est l'état immunodépressif maternel qui permet l'implantation du blastocyste et son maintien dans l'utérus. Différentes modifications métaboliques et physiologiques vont se mettre en place avec en premier lieu une sécrétion d'hormones de grossesse telles que des hormones polypeptidiques (hormone gonadotrophine chorionique ou hCG, appelée communément « hormone de grossesse » avec les tests grossesse effectué au-delà des premiers signes/symptômes de grossesse) et des hormones stéroïdes (progestérone/ œstrogène). Les principales modifications physiologiques sont dues à la progestérone qui permet de réduire le tonus de la musculature lisse évitant principalement toute contraction utérine pendant la grossesse. La croissance fœtale et l'hyperactivité placentaire et utérine entraînent de façon globale un hypermétabolisme maternel avec une augmentation de la consommation en oxygène et une augmentation du débit cardiaque (R. Gabriel et al. 2020). Des modifications sanguines se mettent en place avec une augmentation précoce du volume plasmatique et du volume globulaire et également des modifications de l'hémostase avec une hypercoagulabilité protégeant la femme contre les hémorragies.

Cette période peut aussi conduire à un état d'anxiété important de la mère (avec un stress qui s'accompagne d'une augmentation de cortisol), voire un état dépressif dans certains cas. Il est admis aujourd'hui que la grossesse ne s'accompagne pas automatiquement du désir d'enfant. Selon l'organisation mondiale de la santé, une grossesse menée à terme sur quatre n'est pas attendue en premier lieu. Même si la DRESS (direction de la recherche, des études, de l'évaluation et des statistiques) comptabilise 232 000 interruptions

volontaires de grossesse (IVG) avec une majorité de femmes concernées ayant entre 20 et 29ans, une grossesse non planifiée ne veut pas forcément dire que celle-ci n'est pas souhaitée ou qu'elle ne sera pas maintenue. Ces grossesses spontanées, qui ne sont pas immédiatement connues, peuvent entraîner un risque supérieur de consommation d'alcool en début de grossesse et des risques pour la santé (WHO, 2019 ; Bellizzi S et al, 2020).

Si l'on considère que l'alcool est une substance toxique largement consommée à l'âge de jeune adulte et qu'une femme sur quatre n'avait pas prévu de grossesse, nous comprenons aisément les risques élevés d'une exposition de l'embryon/du fœtus à l'alcool dans cette tranche d'âge de la population.

Risques, pathologies de grossesses et syndromes d'alcoolisation *in utero*

La grossesse est une des périodes les plus sensibles de la vie de l'individu, que ce soit pour la femme ou pour l'enfant. Soumises à de nombreux facteurs, les pathologies de grossesse sont multiples, variées et avec des degrés de gravité plus ou moins importants pour la mère et son fœtus. Parmi les pathologies de grossesse les plus surveillées et étudiées, nous notons :

- Le diabète gestationnel
- Les retards de croissance intra-utérin (RCIU)
- La cholestase gravidique
- La prématurité
- La prééclampsie
- La rupture prématurée des membranes
- Les morts fœtales *in utero* après 22SA

Ces pathologies, de plus en plus étudiées, peuvent avoir des causes multiples : génétiques, environnementales, et bien sûr toxicologiques. Pour certaines d'entre elles, la consommation d'alcool pendant la grossesse peut en être une. Ainsi, il est indispensable de décrire les différents niveaux de syndromes après une alcoolisation *in utero*.

Considérée aujourd'hui comme première cause de déficit mental non génétique et évitable, l'alcool va induire, chez les enfants exposés *in utero*, des troubles plus ou moins importants. Ainsi, 3 niveaux de syndromes sont distingués : les syndromes d'alcoolismes

foëtaux (SAF), les syndromes d'alcoolismes foëtaux partiels ou incomplets (SAFp) et les troubles causés par l'alcoolisation foëtale (TCAF) (incluant les troubles neurodëveloppementaux liés à l'alcool (TNDLA)).

Syndrome d'alcoolisme foëtal

Le SAF, syndrome d'alcoolisme foëtal, est l'atteinte la plus sëvère de l'intoxication foëtale à l'alcool. Ce syndrome, lié à une forte consommation d'alcool au cours de la grossesse est caractërisé par des anomalies morphologiques visibles, des atteintes neurologiques sëvères (et notamment des retards mentaux importants) et à plus long terme, des troubles neurocognitifs et neurocomportementaux. La toxicité dû à la consommation d'alcool pendant la grossesse sur la descendance est connue depuis longtemps. Le docteur Paul Ladrague en 1901 écrit dans son manuscrit de thèse (en préface de ce manuscrit), « *N'est-il pas triste de voir ces petits êtres sans défense subir, dans leur fatale rigueur- et cela, bien souvent, comme nous le montrerons, avant même de voir le jour- les effets d'un empoisonnement qui menace sinon leur vie même, du moins la bonne santé de toute leur existence* ». Incitant les femmes (de la conception jusqu'à l'allaitement) et leur conjoint (au moment de la conception) à ne pas consommer d'alcool il décrira crument les faits ainsi : « *Les descendants des alcooliques offrent tous, sauf exception, des phénomènes de dégénérescence, dégénérescence qui se caractérise par des atrophies partielles portant uniquement ou à la fois sur le corps et sur l'esprit : anomalie de développement dans la vie intra utérine, état générale faible, intelligence en dessous de la moyenne* ». Au fil des ans et des recherches, les effets de l'alcoolisation au cours de la grossesse, bien que restant proches des constatations primaires du Dr Ladrague, se sont affinés, précisées. En particulier, le manuscrit du docteur Paul Lemoine en 1967 dans ses travaux sur « les enfants de parents alcooliques » apporte la première preuve de caractéristiques dysmorphiques faciales en rapport avec l'exposition à l'alcool au cours de la grossesse. En 1973, des Dr Jones et Smith définissent le terme « syndrome d'alcoolisme foëtal » (SAF) pour d'écriture l'ensemble des anomalies observées chez les enfants nés de mères alcooliques (Jones at al. 1973). Bien décrit au niveau des conséquences, les mécanismes biochimiques et moléculaires de ce syndrome sont complexes, multifactoriels et restent pauvrement documentés.

Les atteintes morphologiques sont les premières anomalies détectables chez l'individu porteur de SAF ; Ainsi le rapport clinique des docteurs Janet F. Williams et Vincent C.

Smith présente trois éléments du faciès facilement diagnostiquables à la naissance : de courtes longueurs de fentes palpébrales, un philtrum lisse et la lèvre supérieure fine (Figure 5) (Williams JF and Smith VC 2015). En 2016 le collège national gynécologique et obstétrique français (CNGOF) a allongé cette liste par la micrognathie (hypoplasie de la

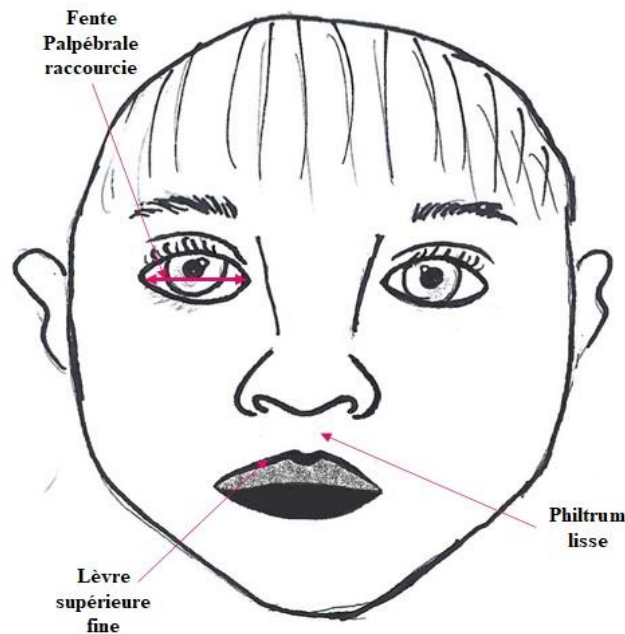


Figure 5 Profil d'une enfant présentant les 3 caractéristiques faciales diagnostiquées par Williams Janet F., Smith Vincent C. du Syndrome d'alcoolisme fœtal. ©Dessiné par Jessica Dalmasso

mâchoire inférieure) et l'effondrement de la racine du nez.

De manière moins systématique, avec le SAF, il est possible d'observer un retard de croissance intra utérin (RCIU) qui se manifeste par un poids de naissance en dessous du 5^e percentile et un retard de croissance chez l'enfant à plus long terme. Dans la majorité des cas un petit poids à l'âge gestationnel (PAG) est observé qui se caractérise par un poids de naissance inférieur au 10^e percentile (Leno D.W.A, Camara M.K, Kouyate S. et al. 2017). Que ce soit les RCIU ou les PAG, le défaut de croissance gestationnel augmente les risques de pathologies cardiovasculaires, d'anomalies neurodéveloppementales et de dysfonctionnement du système endocrinien (Figueras F., Gratacos E.,2017).

Selon un rapport de l'OMS en 2020, au niveau mondial, 303 000 nouveau-nés meurent au cours de la période de périnatalité des suites d'anomalies congénitales (dont celles liées à l'alcool) (OMS, 2020). Celles-ci, lorsqu'elles ne sont pas fatales, peuvent entraîner des conséquences désastreuses sur l'enfant à plus long terme mettant en jeu sa famille, le

système de santé et celui de l'économie (les structures spécialisées ayant un coût considérable pour l'état). Parmi l'entière des troubles causés par l'alcool au cours de la grossesse, les malformations cérébrales sont les plus communes et souvent les plus graves. Une revue de Courtney Caputo, Erin Wood et Leila Jabbour (2016) décrit les premières découvertes par autopsies de cerveaux d'enfants SAF décédés après la naissance (ou dans la petite enfance) (Caputo, Wood, Jabbour 2016). Les analyses par IRM ont permis de décrire précisément les zones touchées, leurs aspects morphologiques ainsi que leurs troubles fonctionnels liés. Ainsi, ces expérimentations ont pu mettre en évidence une diminution du volume global du cerveau ainsi que ses composants (matière grise et blanche) et l'amincissement des corps calleux (Nunez et al. 2011).

De la même façon il a été démontré sur un modèle murin que l'alcool diminuait la vasculogénèse et l'angiogénèse du système nerveux central impactant ainsi sévèrement la mise en place du réseau neuronal chez le fœtus (Lecuyer M et al. 2017). Une atteinte particulière de la crête neurale a été décrite, pouvant être responsable des anomalies du faciès, et de déficits neurocognitifs (Smith S. et al, 2014). Parmi les dommages causés par l'alcool sur le cerveau humain, les problèmes de langage, les déficits de l'attention et les retards mentaux étaient les plus courants pendant l'enfance (Smith S. et al., 2014 et Glass L. et al., 2014).

Des études neuropsychologiques ont établi que presque tous les domaines cognitifs évalués sont affectés par l'exposition prénatale à l'alcool très souvent liés au SAF (Nunez et al., 2011). L'effet le plus courant est le dysfonctionnement du système nerveux central (Mattson et al., 2011 ; Riley et al., 2011). L'exposition à l'alcool provoque des défauts de l'apprentissage, de la cognition, des performances motrices, de la perception et des difficultés comportementales (Kelly et al., 2000 ; Riley et McGee, 2005 ; Mattson et al., 2011). Les troubles autistiques et les dysfonctionnements émotionnels sont aussi étudiés dans le cadre du syndrome d'alcoolisme fœtal (Varadinova M. & Boyadjieva N. 2015).

Les enfants porteurs du SAF sont, de manière générale, nés de mères alcooliques et leur syndrome est la conséquence d'une consommation chronique au cours de la grossesse (et parfois même de poly-consommations). Comme pour tout syndrome il existe des formes partielles (SAFp) ou incomplètes. Les enfants porteurs de SAFp ne présentent pas la totalité des symptômes du SAF mais tous présentent, au minimum, un déficit intellectuel associé à un stigmate du SAF à la naissance (Crépin G., Bréart G., 2016).

Cependant, de plus en plus de femmes consomment de manière involontaire en début de grossesse ou de manière « festive » en dose unique. A ce jeu du hasard, il a été reporté que certains enfants ont développé des troubles neurocognitifs, neurocomportementaux et sociétaux divers. L'ensemble de ces troubles causés par l'alcoolisme fœtal (TCAF) a permis un nouvel axe d'étude de l'exposition prénatale à l'alcool.

Troubles causés par l'alcoolisme fœtal

Alors que, dans le monde les syndromes d'alcoolisme fœtaux (SAF) touchent entre 0.5 et 3 enfants sur mille, les troubles causés par l'alcoolisme fœtal (TCAF) sont estimés à 9 pour mille des naissances (rapport du ministère de la santé de 2010). Selon SAFFRANCE, en France, un enfant sur mille est atteint de SAF dans sa forme complète et un enfant sur cent naît atteint de TCAF. Ces chiffres, bien que déjà très élevés sont exhaustifs puisque les SAF partiels ne sont pas toujours diagnostiqués et, à ce jour, il n'existe pas de test de dépistage de l'alcoolisation *in utero* assez sensible pour détecter les TCAF à la naissance.

L'ensemble des TCAF est la première cause non génétique de pathologies neurodéveloppementales. Ces TCAF sont beaucoup moins bien décrits et difficilement mesurables. Les enfants porteurs de TCAF ne présentent pas d'anomalie morphologique ce qui rend leur diagnostic souvent tardif et particulièrement ardu. Les conséquences de cette alcoolisation « modérée » sont des troubles neurocognitifs et neurocomportementaux. Notamment les enfants TCAF présentent des difficultés d'apprentissage et d'exécution de tâches complexes, mais également un déficit d'attention, de concentration et d'élocution (Mattson et al. 2011). Burd a rapporté dans une revue les différents résultats observés par son équipe de l'effet de l'exposition prénatale à l'alcool sur le Quotient Intellectuel et les diagnostics de TDAH (troubles de déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité) (Burd, 2016)). De plus ces TDAH qui persistent à l'âge adulte semblent augmenter le risque de présenter une addiction aux substances de type drogue ou alcool (Wilens Timothy E., 2004). Enfin un lien a été démontré entre TDAH et les Troubles du comportement Alimentaire (Kaisari et al. 2017). L'ensemble de ces TCAF ont été reportés dans le Tableau 2 (Crépin G. et Bréart G., 2016).

Tableau 2 Aperçu, non exhaustif, de l'ensemble des troubles causés par l'alcoolisme fœtal au cours de la vie de l'individu TCAF ; Tableau modifié d'après le rapport de l'Académie National de Médecine rédigé par Crépin G. et Bréart G. (2016)

PERIODE DE LA VIE	TROUBLES CAUSES PAR L'ALCOOLISATION FŒTALE
NAISSANCE	<ul style="list-style-type: none"> - Troubles d'inadaptation - Signe de sevrage - Difficulté d'alimentation - Troubles du sommeil
PERIODE SCOLAIRE	<ul style="list-style-type: none"> - Anomalies du comportement (Attitudes oppositionnelles avec provocation / défiance d'autorité/ agressivité avec violences/comportement destructifs) - Troubles cognitifs - Déficit intellectuel (QI diminué de 20points) - Difficultés d'apprentissage (dyslexie, dyscalculie), - TDAH - Difficulté d'intégration
AGE ADULTE	<ul style="list-style-type: none"> - Retard intellectuel - Troubles du comportement (délinquances) - Troubles du jugement - Impulsivité/ instabilité - Troubles du sommeil - Désordres émotionnels - Addiction et dépendance à l'alcool et/ou aux autres drogues

Dès lors les enjeux majeurs de la recherche sur la toxicité de l'alcool sont 1) de comprendre les mécanismes de toxicité de l'alcool sur le cerveau fœtal et 2) de trouver des biomarqueurs de l'exposition du fœtus à l'alcool *in utero* afin de détecter et prendre en charge le plus précocement possible les enfants atteints de ces syndromes.

Mécanismes de toxicité de l'alcool sur le cerveau

Dès les premiers stades de l'organogenèse et ce jusqu'après la naissance, le développement du cerveau et la mise en place de tout le réseau neuronal sont en perpétuelle évolution. Afin d'appréhender au mieux l'impact de l'alcool sur le

développement du système nerveux il est important d'en connaître, plus en détails, les phases majeures de développement ainsi que les acteurs qui entrent en jeu.

C'est de l'ectoderme que vont dériver toutes les structures du système nerveux central (SNC). Dès la 4^e semaine de développement, l'ectoderme se différencie et forme la plaque neurale (c'est la première étape de la neurulation). Cette plaque neurale, va se replier progressivement pour former le tube neural qui sera à l'origine de la totalité du système nerveux (Figure 6). Cette étape, appelé neurulation, intervient dès le 22^e jour de grossesse, apparait souvent avant même que la femme soit au courant de son état gravide. Un défaut de neurulation est fréquent (un cas sur 500) et peut mener à un défaut de développement de la totalité de l'embryon.

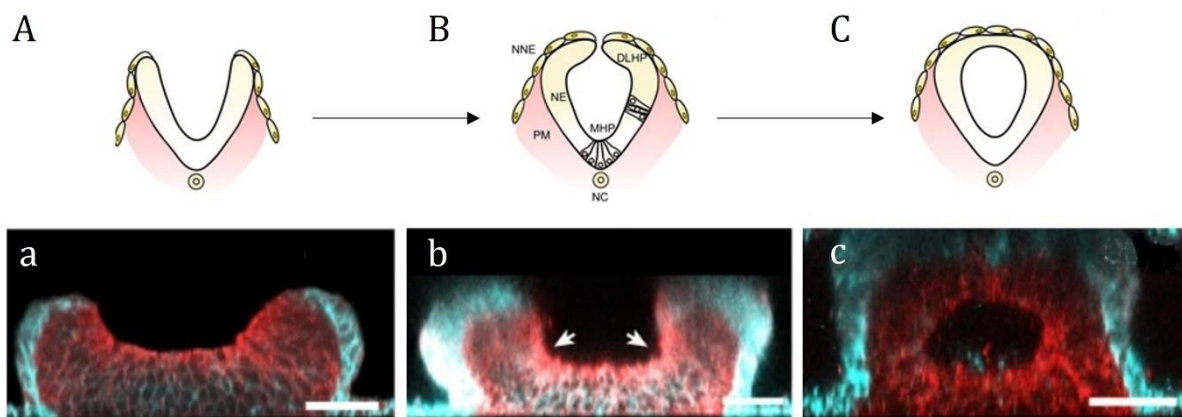


Figure 6 Vue d'ensemble de la neurulation (modifié d'après deux études menées sur la neurulation)- A-B-C Représentation schématique de la neurulation avec dans l'ordre chronologique A- la formation de la gouttière neurale par le feuillet ectodermique, B- Les bords de la gouttière neurale se replient pour former le tube neural et C- Le tube neural se referme par fusion des cellules de l'ectoderme. DLHP= dorsolateral hinge point ; MHP=median hinge point; NC =notochord; NE= neuroepithelium; NNE= non-neural ectoderm; PM= paraxial mesoderm (Nikolopoulou E. et al. 2017). Les images a,b,c correspondent à des images prises en microscopie à fluorescence de la formation du tube neural (selon le même schéma que A-B-C) d'un modèle de cellules souches en culture 2D caractérisé par Karzbrun, E. et al. 2021 – scale bars : 50µM

A partir du 26^e jour, trois vésicules primitives du cerveau vont se différencier : le cerveau antérieur (qui donnera plus tard la vésicule optique, le thalamus dans son ensemble, le bulbe olfactif, le cortex cérébral, les corps calleux, la substance blanche etc.), le cerveau médian (qui donnera entre autres l'aqueduc cérébral et le tectum) et le cerveau postérieur (qui donnera le cervelet, le pont, le quatrième ventricule et le bulbe) (Figure 7).

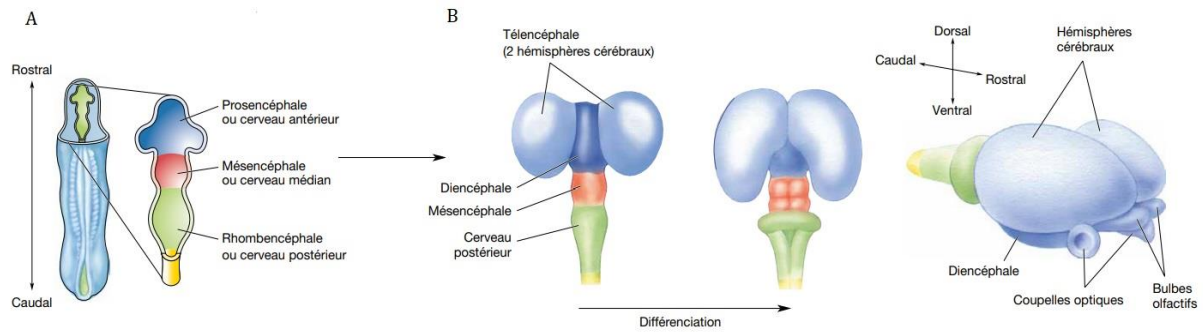


Figure 7 Représentation schématique de la différenciation du cerveau. A Vue de dessus des 3 vésicules primitives B-Différenciation du télencéphale. Modifié d'après « Neurosciences,exploring the brain » par Bear M.F., Connors B.W., Paradiso M.A. (édition française-2013)

La mise en place du cortex cérébral débute vers la 5^e semaine de grossesse. C'est de ce cortex que dérivent tous les systèmes responsables des sensations/perceptions, du mouvement volontaire, de l'apprentissage, du langage et de la cognition (Bear M.F. Connors B.W, Paradiso M.A. 2013). Le télencéphale, vésicule provenant du cerveau antérieur, va permettre la production de neurones et de cellules gliales. La production des neurones du néocortex tourne à plein régime entre la 5^e semaine et le 5^e mois de grossesse, à raison de 250 000 nouveaux neurones par minute. C'est au cours de cette période de neurogenèse que vont se mettre en place les systèmes synaptiques et dendritiques. Cette période intense, est fortement influencée par l'expression de facteur de transcription (elle-même soumise à différents facteurs environnementaux) et va permettre la production de neurones polarisés, qui vont migrer à différents endroits du cortex. (Ross et al. 2003). Les facteurs de mort-cellulaire vont eux aussi jouer un rôle très important pour cadrer la mise en place de ce réseau cortical. Les réseaux neuronaux vont donc être soumis à des instructions strictes génétiques permettant de définir leur trajet correct dans l'embryon. Deux types de neurones majoritaires vont permettre la mise en place du néocortex : les neurones à glutamate (NMDA) excitateurs et les interneurons GABA (Acide Gamma-aminobutyrique) inhibiteurs. Enfin la prolifération des oligodendrocytes et la formation de la gaine de myéline vont permettre d'augmenter les vitesses de transmission. Ainsi les facteurs environnementaux, les toxiques ingérés par la mère, comme l'alcool, vont pouvoir altérer l'accomplissement de cette structure complexe qu'est la genèse du cerveau humain, et impacter négativement le fonctionnement du système nerveux. En effet, en raison de ses propriétés pharmacologiques, l'alcool va rapidement atteindre la circulation et traverser la barrière hémato-encéphalique fœtale.

Selon le rapport de l'Académie nationale de médecine en 2016 (Crépin G., Bréart G., 2016), il est possible de diviser la grossesse en 3 périodes sensibles et de risque d'exposition prénatale à l'alcool :

- La période pré-implantatoire → risque augmenté d'avortement spontané/ de mort embryonnaire *in utero* (loi du tout ou rien)
- La période embryonnaire → risque augmenté d'anomalies morphologiques et de malformations congénitales (pouvant également conduire à un risque d'avortement prématuré)
- La période fœtale → risques d'anomalies du développement et retards de croissance du fœtus

A ces trois périodes s'ajoute la période avec les risques à distance, c'est-à-dire principalement tous les troubles du comportement. Cela concerne la période des neuf mois de la grossesse. Ainsi, nous nous apercevons que l'alcool impacte toutes les périodes à risque.

Sur le plan mécanistique, les vingt dernières années ont permis de faire avancer la recherche sur la toxicité cérébro-fœtale de l'alcool.

La cible principale de l'alcool est le cortex cérébral. Deux acteurs majeurs, les neurones excitateurs et les interneurons inhibiteurs, sont fortement impactés par l'alcool *in utero*.

Un des premiers effets, bien décrit à ce jour, est la diminution/le blocage des récepteurs NMDA dans le cas d'une exposition prénatale à l'alcool (Ikonomidou et al. 2000 ; Naasila et al. 2002 ; Chandrasekar R. 2013), pouvant conduire à la diminution du nombre de neurones et la neurodégénérescence apoptotique généralisée du cerveau (Crépin G. et Bréart G., 2016 ; Ikonomidou et al. 2000). A l'inverse, l'alcool va induire une augmentation de l'activité des récepteurs GABA, (Ikonomidou et al. 2000 ; Koulentaki and Kouroumalis 2018) induisant à leur tour l'apoptose neuronale en excès, pouvant expliquer les troubles neurodéveloppementaux associés à l'alcoolisation *in utero*. Cette perte neuronale va entraîner une gliose réactionnelle, c'est-à-dire une prolifération des cellules gliales (Boulfoul T. 2019). Il en résulte différents troubles cognitifs chez l'adulte.

Comme décrit plus haut, dans le cadre des troubles causés par l'alcoolisme fœtal, la taille du corps calcaux est diminuée par l'exposition à l'alcool *in utero* (Nunez et al. 2011,

Bookstein et al., 2001). Cette diminution du corps calleux s'accompagne d'une diminution de la substance blanche, et notamment par la perte d'oligodendrocytes (Newville et al. 2017) et de la diminution de l'épaisseur de myéline (Newville et al. 2021).

Le rapport de l'académie de médecine rapporte également un impact important de l'alcool sur l'hippocampe, induisant des troubles cognitifs, notamment une déficience dans l'accomplissement d'une tâche comportementale et de la mémoire (Richardson et al. 2002).

Enfin, l'alcool impacte l'angiogenèse et la vasculogenèse cérébrale notamment par la diminution significative de facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF, entraînant une désorientation des micro-vaisseaux corticaux (Lecuyer et al. 2017).

Ces altérations, importantes, peuvent induire des troubles définitifs chez l'enfant à naitre et l'adulte à plus long terme. Or, la plasticité cérébrale persistante au cours des premières semaines de vie pourrait être une opportunité de fenêtre thérapeutique. La nécessité de trouver des biomarqueurs de l'exposition à l'alcool *in utero*, afin de détecter et prendre en charge le plus précocement possible les enfants atteints de ces syndromes, devient alors une évidence.

Biomarqueurs d'alcoolisation fœtale :

De manière générale, le diagnostic des enfants SAF se base sur des signes malformatifs avec une reconnaissance faciale (Figure 5). Cependant, l'apparition des troubles cognitifs et neurocomportementaux chez les enfants TCAF sans anomalie morphologique rend leur diagnostic plus complexe. Deux tests permettent le repérage de ces troubles grâce à des échelles standardisées : le MoCA (Montreal Cognitive Assessment) et le BEARNI (Brief Evaluation of Alcohol-Related Neuropsychological Impairment), avec une fiabilité de diagnostic de 87% et 80% respectivement. Les facteurs limitants de ces tests sont qu'ils sont 1) utilisables seulement en dehors de la fenêtre thérapeutique (puisque'ils nécessitent une mise en place des capacités cognitives) et 2) qu'ils ne repèrent pas forcément les troubles légers (Angerville B. 2018).

Historiquement les marqueurs biochimiques de l'alcoolisation ne manquent pas : Ethanol, Acétaldéhyde, Esters éthyliques d'acides gras, Acétone, Aldéhyde déshydrogénase, Aspartate aminotransférase, Y-Glutamyl-transférase, Hexosaminidase etc. De fait, de

nombreux biomarqueurs de SAF aigu ont été mis en évidence (Chabenne et al. 2014). Ceux-ci peuvent être répartis en quatre catégories : clinique, moléculaire, métabolique, imagerie ; Ces études s'appuient sur tous les prélèvements disponibles à la naissance : méconium, cordon, placenta, sang, plasma, urine.

Notamment le dosage de la CDT (Carbohydre Deficient Transferrin) et de la Y-GT (Gamma Glutamyl Transferase) maternelles, marqueurs de consommation chronique d'alcool, associées à la recherche de l'acétaldéhyde dans le sang fœtal ou le sang de cordon permet de prévenir des risques de troubles associés à l'alcoolisation *in utero* post natal (Cook, 2003). De la même manière, la recherche d'éthylglucuronide (EtG), d'éthylsulfate (EtS) et d'esters éthyliques des acides gras (EEAG) dans le méconium du nouveau-né mais aussi dans le sang, les urines ou les cheveux maternels peut être utilisée dans les cas de binge-drinking ou d'alcoolisme chronique (Bearer et al. 2003). Ce sont des marqueurs directs d'une consommation d'alcool pouvant être identifiables dans différentes matrices biologiques.

Malgré tout, ces biomarqueurs ne sont pas assez sensibles et efficace dans le temps pour être spécifiques d'une intoxication prénatale modérée voir occasionnelle à l'alcool. De fait, une consommation involontaire au début de la grossesse ne pourra pas être identifiée par ces biomarqueurs à la naissance. Différentes pistes ont alors été étudiées ces dernières années pour le dépistage des TCAF, hors SAF. Une étude a mis en évidence la spécificité de l'oléate d'éthyle (un ester éthylique d'acide gras) pour la consommation minimale d'un verre d'alcool fort (40%Vol) ingéré par jour au deuxième et troisième trimestre de grossesse (83.3% de spécificité et sensibilité de 84.2%) (Bearer et al. 2003). Ce biomarqueur, bien que peu adapté à la consommation occasionnelle d'alcool au cours de la grossesse reste tout de même assez sensible et a permis de mettre en évidence l'accumulation de l'alcool fœtal dans le cadre d'alcoolisation *in utero*.

L'analyse histologique des vaisseaux du cordon ombilical, les signes cliniques en échographie (RCIU, volume de liquide amniotique) ou en IRM (diminution des corps calleux) ont été approfondis dans les cas de TCAF ; tout ceci sans résultats répondant au cahier des charge d'un biomarqueur fiable, imposant aux chercheurs de trouver de nouveaux biomarqueurs moléculaires ou métaboliques des TCAF.

Récemment, plusieurs études d'une équipe canadienne ont pu mettre en évidence une signature de méthylation de l'ADN. Par prélèvements muqueux chez une cohorte d'enfants et d'adolescents TCAF, ils ont pu déterminer une signature fiable et ainsi développer un programme de prédiction épigénétique des TCAF (Lussier et al. 2018). Ces méthylations, résultats d'une exposition prénatale à l'alcool semblent, au vu de leur stabilité dans le temps et de leur spécificité, être de bons candidats de biomarqueurs précoces et une cible thérapeutique potentielle.

Enfin depuis quelques années seulement, les chercheurs se sont intéressés à l'organe éphémère que l'on pensait jusque-là être simplement une interface mère-fœtus : le placenta.

En 2010, une analyse transcriptomique des placentas, issus d'un modèle de rat avec une consommation volontaire d'alcool, a mis en évidence qu'un grand nombre d'ARNm placentaires étaient altérés, y compris des gènes codant pour des métalloprotéinases, le PlGF ou des facteurs de croissance tels que l'EGF (transforming growth factor alpha and epithelial growth factor) contenant une protéine de matrice extracellulaire. (Rosenberg et al, 2010).

En 2017, une étude menée sur un modèle murin de rates gravides exposées *in vivo* à l'alcool quotidiennement a pu mettre en évidence une signature protéique de l'alcool dans le placenta. Parmi les protéines détectées, certaines étaient reliées au métabolisme de l'alcool mais de manière intéressante, certaines étaient liées au développement du fœtus ou à des pathologies gestationnelles comme la prééclampsie (Davis-Anderson et al. 2017).

La même année, le Dr Bruno Gonzalez et son équipe se sont intéressés à l'effet de l'alcool sur le cerveau et le placenta dans un modèle murin (Lecuyer M et al. 2017). Des souris gestantes ont été exposées à l'alcool *in vivo*, puis le placenta et le cerveau fœtal ont été récupérés avant la naissance. En étudiant ces deux organes simultanément, l'équipe a été capable de mettre en évidence, entre autres, que l'alcoolisation *in utero* modifiait la sécrétion placentaire d'une hormone de croissance pro-angiogénique, le PlGF, induisant une désorganisation vasculaire corticale chez le fœtus. La répression ciblée de l'expression du PlGF dans le placenta a imité des défauts vasculaires cérébraux prouvant l'existence d'un axe de développement placenta-fœtal. La transposition chez l'homme a

démontré une forte corrélation entre les anomalies angiogéniques placentaires et les altérations vasculaires corticales (Lecuyer M et al. 2017).

Le placenta, longtemps considéré comme déchet physiologique, devient alors un réservoir de biomarqueurs potentiels de TCAF.

Le placenta Humain :

Généralités

Le placenta humain (Figure 8), organe transitoire, est avant tout une surface d'échange entre la mère et le fœtus. Cet organe dit hémochorial du fait que le chorion baigne directement dans le sang maternel est également décidual parce qu'il est amené à être expulsé au moment de l'accouchement. C'est un organe de forme discoïdale qui joue un rôle important lors de la fixation du conceptus (l'embryon et ses annexes) à l'endomètre, mais aussi dans le maintien de la gestation par de multiples fonctions de transferts materno-fœtaux, de productions hormonales variées et d'intervention dans les processus immunitaires.

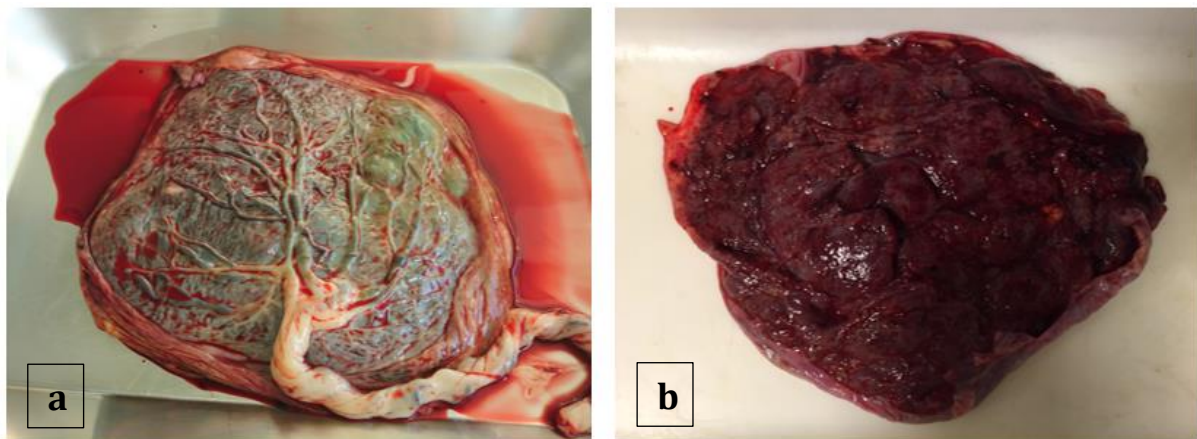


Figure 8 Le placenta humain, Photographie crédit J. Dalmasso, 2016 A gauche (a) la face fœtale tapissée par l'amnios qui relie le placenta au fœtus par le cordon ombilical ; A droite (b) la face maternelle composée des cotylédons recouverts de la caduque basale et qui est ancrée dans l'utérus maternel.

Il est composé de deux faces, une face fœtale (choriale) lisse (Figure 8 (a)), tapissée par l'amnios et reliant le placenta au fœtus par le cordon ombilical et une face maternelle qui est recouverte par la caduque basale (tissu d'origine maternelle) (Figure 8 (b)). Cette face maternelle est compartimentée partiellement en cotylédons qui sont délimités par des sillons non profonds. On distingue la caduque et le placenta à proprement dit, par la chambre intervillieuse et les villosités choriales qui sont entre la plaque basale et la plaque

choriale (Figure 9). A terme, le placenta humain comporte 20 à 30 cotylédons et possède un diamètre d'environ 20 cm.

Le placenta humain est indispensable au maintien de la grossesse et au développement du fœtus. Seule interface entre la mère et le fœtus, il assure un rôle de filtre et d'échanges en gaz et en nutriments nécessaires à la croissance fœtale (Evain Brion D. et al 2010).

Développement et histologie

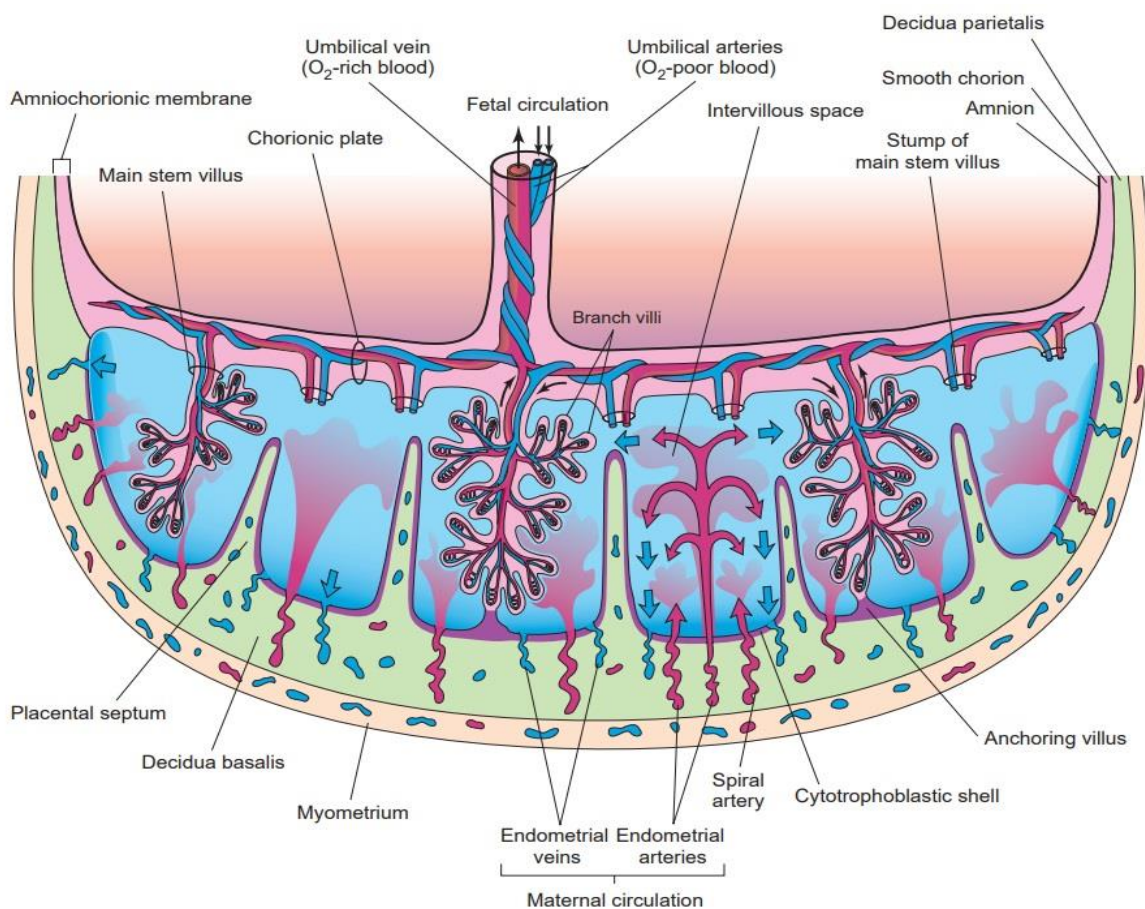


Figure 9 Représentation schématisique d'une coupe transverse de placenta humain à terme. D'après "The developing human: clinically oriented embryology" par Moore K.L., Persaud T.V.N, Torchia M.G. (Edition originale 2016)

Le placenta se met en place très précocement au cours de la grossesse. En effet, dès l'adhérence du blastocyste à la cavité utérine, le trophoctoderme (couche cellulaire épithéliale du blastocyste) va se différencier en deux types cellulaires, le cytotrophoblaste (interne) et le syncytiotrophoblaste (externe) en contact avec l'endomètre, qui vont franchir l'épithélium et envahir l'endomètre. Le blastocyste, alors entouré du syncytium (ou syncytiotrophoblaste), va s'enfouir dans l'endomètre. Son implantation va déclencher la décidualisation de l'endomètre (Figure 10).

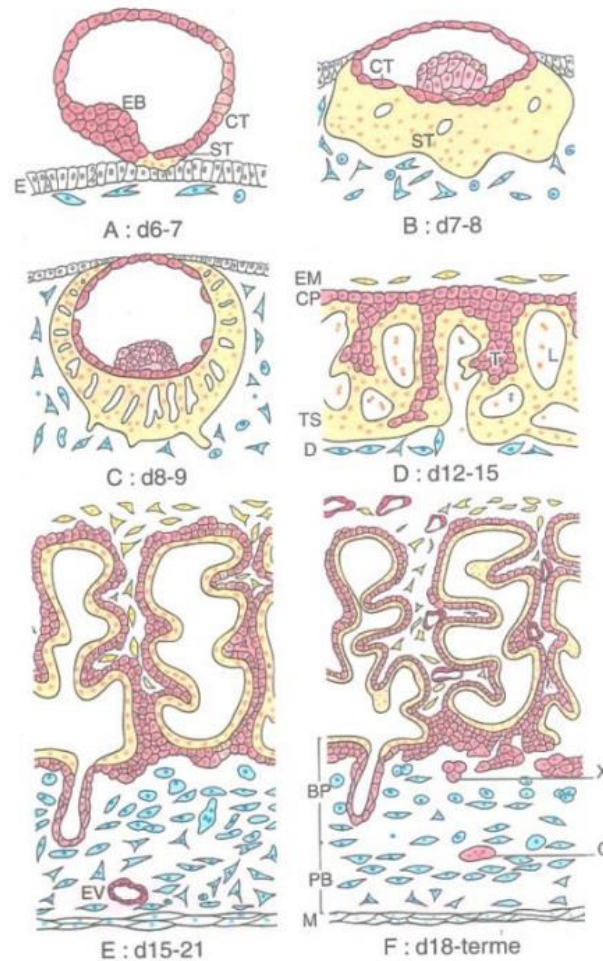


Figure 10 Représentation schématique des différentes étapes du développement du placenta humain d'après « Pathology of the human placenta » de Benirschke et Kaufman (2000) BP : plaque basale, CP : plaque chorionale, CT : cytotrophoblaste, ST : syncytiotrophoblaste, D : décidue, G : cellules géantes, VE : vaisseau endométrial, X : trophoblaste extravilloux, L : lacunes de sang maternel

Dès le 10^e jour, le syncytium va se creuser des lacunes dans lesquelles vont commencer à se déverser le sang qui provient des artères utérines. Les colonnes de cytotrophoblastes entourées de syncytiotrophoblastes sont alors appelées villosités chorionales primaires. A la mise en place des trois feuillets embryonnaires, la villosité secondaire sera composée d'un axe mésenchymateux en son centre, dérivé du mésoderme et donc d'origine

embryonnaire. Enfin la structure définitive de la villosité pourra être mise en place dès l'apparition des vaisseaux embryonnaire au niveau du mésenchyme, vers la 3^e semaine de développement (Figure 10).

Les lacunes, alors creusées dans le syncytium deviennent l'espace intervilloux. C'est cet espace, à l'interface directe entre la face maternelle et la face fœtale qui servira d'espace d'échanges entre la mère et le fœtus. Pendant une partie du premier trimestre de grossesse (environs jusqu'à 10SA) cet espace, très mince, dans lequel baignent les villosités chorales n'est perfusé que d'un filtrat plasmatique qui provient des artères utérines obstruées par des cellules trophoblastiques endovasculaires. Ces bouchons trophoblastiques amènent le placenta dans un espace d'oxygénation minimal nécessaire au début de la grossesse pour la maturation des villosités. Ces cellules trophoblastiques se délitéront au cours du premier trimestre pour permettre au sang maternel avec les éléments figurés du sang d'emplir l'espace intervilloux et ainsi être en contact direct avec la villosité chorale (Figure 11).

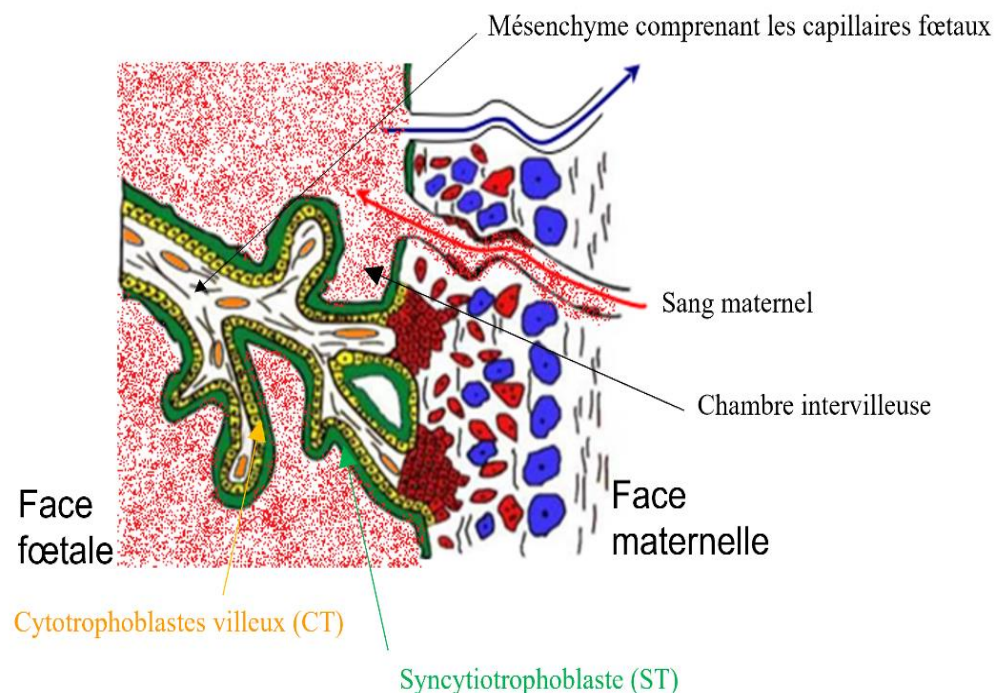


Figure 11 Représentation schématique d'une villosité dans l'espace intervilloux. Celle-ci est composée d'un axe mésenchymateux qui contient les capillaires fœtaux et est bordée de cellules trophoblastiques mononuclées (les cytotrophoblastes CT) et multinuclées (les syncytiotrophoblastes ST). La villosité baigne dans le sang maternel qui provient des artères utérines spiralées. Modifié d'après Le placenta Humain, D Evain-Brion 2010.

Les propriétés pro et anti angiogéniques du placenta sont essentielles au développement physiologique du fœtus. En effet cet organe, qui va se développer tout au long de la grossesse pour permettre d'alimenter et de protéger au mieux le fœtus, va nécessiter un remodelage utérin constant. Afin de vasculariser au maximum et, de fait, faciliter les échanges entre la mère et le fœtus au niveau de l'espace intervilloux, le trophoblaste produit de nombreux facteurs angiogéniques : VEGF, PlGF, FGF, Angiopoïétine 1 et 2, Angiogénine, hCG, EGF, IGF-2, Leptin, sVEGFR-1 etc. Ce remodelage vasculaire permet ainsi d'augmenter de 20 à 25% la proportion du débit cardiaque maternel qui arrive dans l'utérus et la chambre intervilloux au 3e trimestre. A ce moment le débit utérin sera donc de 500 à 700mL/min en fin de grossesse.

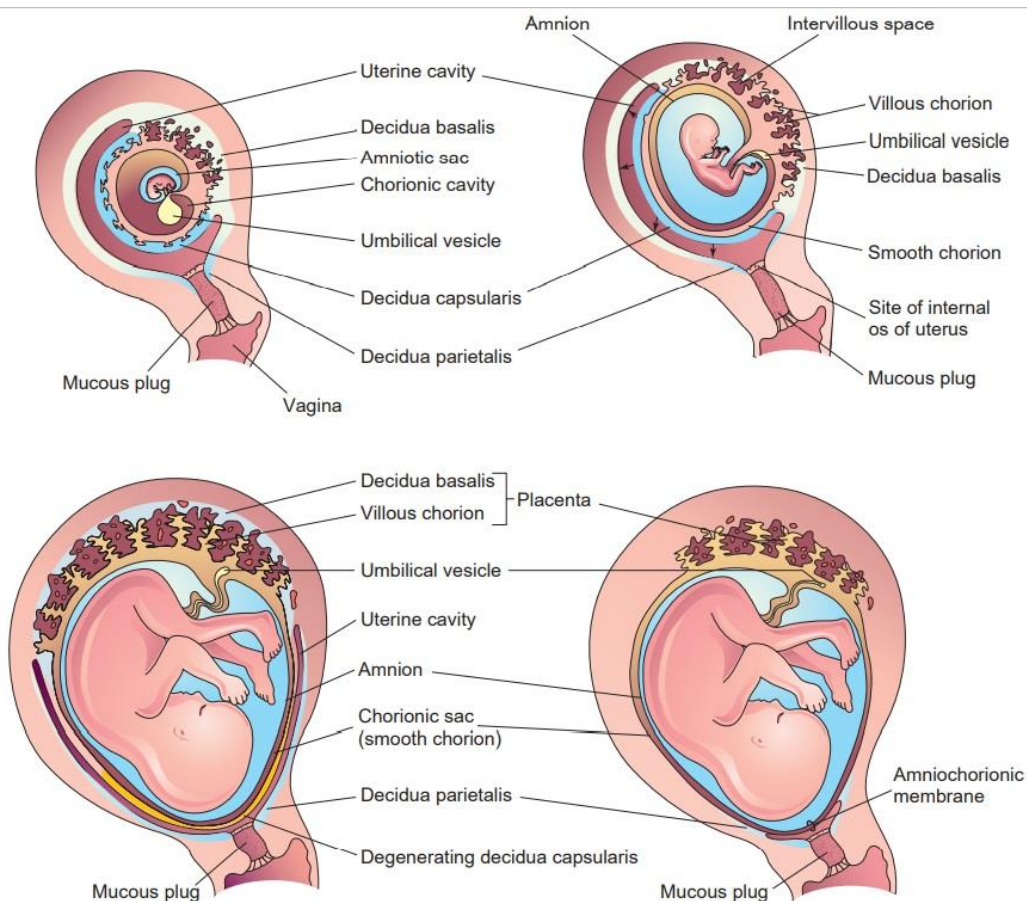


Figure 12 Représentation schématique du développement du placenta et du fœtus entre la 5^e et la 22^e semaine de grossesse. D'après "The developing human: clinically oriented embryology" par Moore K.L., Persaud T.V.N, Torchia M.G. (Edition originale 2016)

Du fait que le sang maternel ne passe pas au fœtus par des conduits vasculaires, il est accepté de voir l'espace intervilloux comme un réservoir poreux rempli du sang oxygéné par lequel les villosités peuvent puiser librement les nutriments pour nourrir le fœtus. Côté fœtal, deux artères ombilicales drainent le sang du fœtus. Celles-ci possèdent des

branches qui vont couvrir la face placentaire et suivre l'arborisation des cotylédons en se divisant directement en capillaires fœtaux, retrouvés dans les villosités chorales (Figure 13). Ces étapes, permettent la mise en place de la circulation fœto-placentaire, l'unique réseau de communication entre la mère et le fœtus (Figure 12).

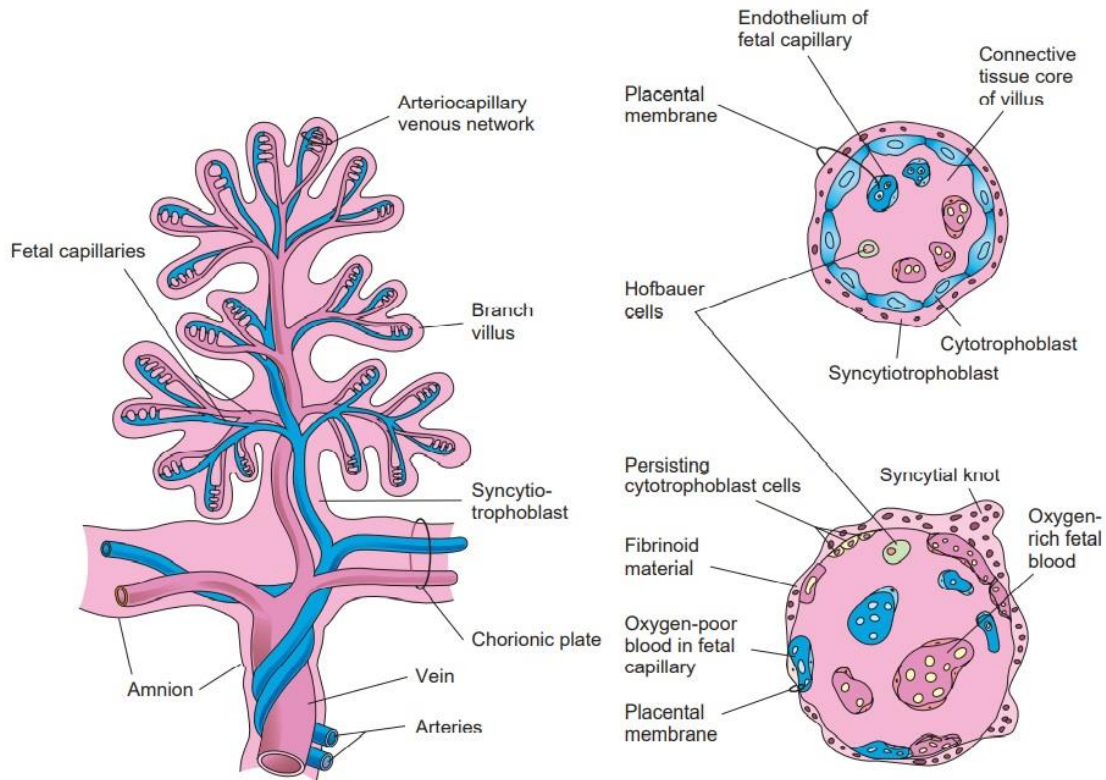


Figure 13 Représentation schématique d'une villosité chorale à partir de la 10^e semaine de grossesse et son renouvellement. D'après "The developing human: clinically oriented embryology" par Moore K.L., Persaud T.V.N., Torchia M.G. (Edition originale 2016).

Tout au long de la grossesse ce réseau va se modifier, s'étendre, et se renouveler *via* son unité structurelle et fonctionnelle : la villosité chorale (Figure 12). Comme décrit précédemment, les villosités chorales (fœtales) terminales sont composées d'un axe mésenchymateux, qui contient les capillaires fœtaux, les cellules mésenchymateuses et les cellules trophoblastiques (Figure 10). La cellule trophoblastique se différencie selon deux voies distinctes : d'une part en cytotrophoblastes villeux (CTV) et d'autre part en cytotrophoblastes extravilleux (CTEV) invasifs. Ces derniers sont indispensables à l'implantation et au remodelage des vaisseaux utérins. Les CTV, cellules mononucléées vont fusionner en syncytiotrophoblastes (ST), cellules multinucléées recouvrant la villosité et en contact direct avec le sang maternel. Le syncytiotrophoblaste, bordé de microvillosités, offre une très grande surface d'échanges, qui croît au fil de la grossesse.

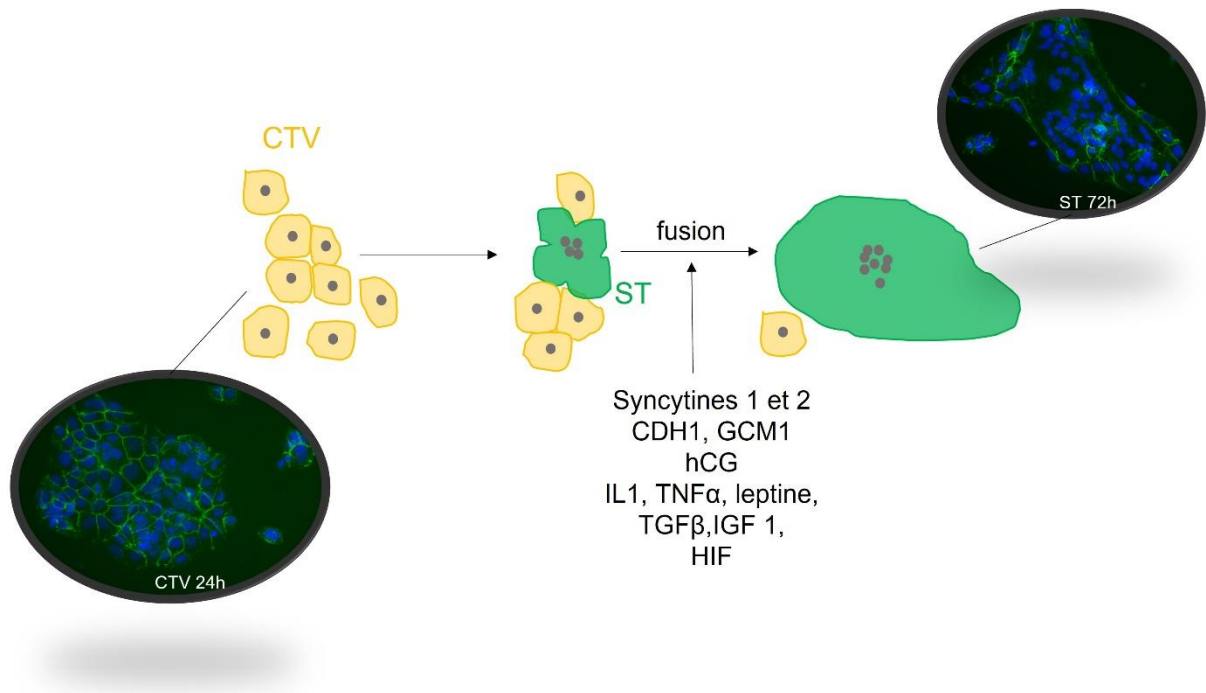


Figure 14 Représentation schématique de de la fusion des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblastes telle qu'observée en culture primaire de CTV ainsi que les acteurs moléculaires impactant cette fusion. Modifié d'après Gerbaud, P. et Pidoux G. (2015). Les images en fluorescence de CTVs à 24h et ST à 72h montre la fusion entre 24h et 72h de culture de CTV d'un même placenta incubé dans du milieu complet. Crédit photo Jessica Dalmasso.

De nombreux facteurs sont impliqués dans la fusion des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblaste. Les deux protéines fusogènes les plus connues sont la Syncytine 1 (HERV-W1) et la Syncytine 2 (HERV-W2) qui sont des glycoprotéines codées par un des rétrovirus endogènes (élément de la famille Human Endogenous Retrovirus-W (HERV-W) et de la famille HERV-FRD, respectivement) intégrés dans le génome des vertébrés au cours de l'évolution et capables d'induire la fusion cellulaire). Ces deux syncytines interagissent chacune avec un récepteur : le récepteur des rétrovirus de type D (sodium dependent neural aminoacid transporter type 2 (RDR/ASCT2)) pour la syncytine 1 et une protéine transmembranaire (major facilitator super family domain containing 2A (MFSD2)) pour la syncytine 2. D'autres facteurs interviennent également dans la régulation de la fusion comme la E-cadhérine (CDH1) présente au niveau du CTV et absente sur le ST et le facteur de transcription Glial Cell Missing 1 (GCM1) impliqué dans l'expression des syncytines. Les cytokines, comme TNF α (Tumor Necrosis Factor-alpha) et IL1 (interleukine-1); la leptine; certains facteurs de croissance, comme TGF β (transforming Growth Factor Beta) et IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1); les œstrogènes et un facteur régulateur d'hypoxie, HIF (Hypoxia-inducible transcription

factors) ; vont également permettre de réguler cette fusion et le renouvellement du syncytium au cours de la grossesse. Enfin la sécrétion d'hCG (hormone gonadotrophine chorionique humaine), induite par le cytotrophoblaste puis par le syncytium va elle aussi permettre la fusion constante des CTV en ST (Figure 14).

Cette fusion, qui permet le bon fonctionnement du placenta, est associée à un constant renouvellement cellulaire *via* des processus d'apoptose par les macrophages et l'élimination des ST « vieux » par les syncytial knots (Figure 13).

En fin de gestation, si on pouvait déplier la surface couverte par les syncytiotrophoblastes, celle-ci avoisinerait 14 à 16 m². Le syncytiotrophoblaste porte la fonction d'échanges et également la charge endocrine du placenta, sécrétant la majorité des hormones placentaires peptidiques, les stéroïdes et autres hormones de croissance indispensables au maintien de la grossesse et au développement du fœtus.

Fonctions endocriniennes

Ces hormones permettent, par des effets autocrines/paracrines, de réguler finement les fonctions placentaires. Leur dérégulation est impliquée dans de nombreuses pathologies de grossesse et le fait qu'elles soient libérées dans la circulation maternelle en fait de bons candidats de biomarqueurs pathologiques.

hCG (hormone Gonadotrophine Chorionique humaine)

L'hormone gonadotrophine chorionique humaine (hCG) est une hormone glycoprotéique produite pendant la grossesse principalement par le trophoblaste. Cette hormone est indispensable pour l'implantation du blastocyste dans l'endothélium utérin, l'angiogenèse et le développement placentaire dès le début de la grossesse (Cole, 2012 / Choi et Smitz, 2014). La mesure de l'hCG maternel, dans le plasma et les urines, peut déterminer le stade précoce de la grossesse. La concentration d'hCG, en cas de grossesse, augmente rapidement dans le sang et l'urine jusqu'à un taux maximum à environ deux mois de grossesse. Après deux mois, il y a une diminution jusqu'au 4^e mois et un plateau jusqu'à l'accouchement. L'hormone gonadotrophine est un dimère de deux unités : les sous-unités alpha et bêta. Cette dernière (hCG β) est l'hCG exprimée dans le plasma maternel et il est utilisée pour détecter certaines complications de la grossesse (comme la trisomie 21). Pendant toute la grossesse, l'hCG est associée au développement du fœtus,

en particulier l'hCG α s'est avérée jouer un rôle dans le développement cognitif (Adibi et al. 2021). *In vitro*, la production d'hCG par les cellules trophoblastiques en culture primaire reflète la bonne santé des cellules. De plus, nous avons estimé que l'hCG module la différenciation morphologique et la transformation fonctionnelle des cytotrophoblastes villosités en syncytiotrophoblastes. Toutes les fonctions de l'hCG sont résumées dans la revue de Nwabuobi et de son équipe (Nwabuobi et al., 2017). De nombreuses publications ont montré que des taux trop élevés ou trop faibles au cours du deuxième et du dernier trimestre de la grossesse sont associés à des complications de la grossesse, notamment des fausses couches, la maladie trophoblastique gestationnelle (GTD), l'hypertension gestationnelle, la prééclampsie, le retard de croissance intra-utérin (RCIU), la mort fœtale *in utero* au-delà de 22 semaines d'aménorrhée et l'augmentation du risque de naissance prématurée (Androutsopoulos et al. 2013 ; Sirikunlai et coll. 2016 ; Nwabuobi et coll., 2017). La production d'hCG régule/est régulée par l'activation des voies de signalisation de la protéine G α /adenylyl cyclase-dépendant cAMP/protéine kinase A (PKA), de la protéine kinase ERK1/2, et la voie de signalisation du phosphatidylinositol 3 kinase PI3K/AKT entre autres (Paulesu et al. 2018 ; Weedon-Fekjær et Taskén, 2012 ; Fournier, Guibourdenche et Evain-Brion, 2015).

De manière physiologique, l'action de l'hCG stimule la production d'œstrogènes et de progestérone (Casarini et al. 2018).

Progestérone (PG)

La progestérone (PG) est une hormone stéroïde qui est également sécrétée par les trophoblastes ; biosynthétisées à partir du cholestérol sérique maternel, par le corps jaune dans un premier temps puis par le syncytiotrophoblaste. Parce que le placenta ne synthétise pas le cholestérol par lui-même, celui-ci est absorbé par le trophoblaste et pénètre dans les mitochondries par le transporteur mitochondrial MLN64. Dans la membrane mitochondriale, le cytochrome de clivage de la chaîne latérale du cholestérol P450 (CYP450 scc), convertit le cholestérol en prégnénolone qui est ensuite métabolisé en progestérone. Cette chaîne réactionnelle est régulée par la voie régulatrice du NADPH (Costa et al. 2015). Les taux de progestérone retrouvés dans le sang maternel augmentent tout au long de la grossesse en parallèle des glucocorticoïdes maternels. La concentration de PG atteint un taux maximum au cours des quatre derniers mois. Finalement, la progestérone diminue après le travail et la délivrance placentaire (Goldman et Shalev,

2007). L'AMPc et la voie mitochondriale sont impliquées dans la régulation de la progestérone (Albrecht et Pepe, 1990). Et la PG elle-même va médier différentes voies comme la voie de signalisation MAPK ou AKT (Mauvais-Jarvis et al. 2021 ; Salazar et coll. 2016). La dérégulation de la sécrétion de progestérone est également impliquée dans de nombreuses pathologies notamment le cancer du sein (Cyrus et al. 2021) et peut être fatale pour le fœtus. Reconnues pour leur rôle immunomodulateur, plusieurs études montrent qu'une carence en progestérone ou un défaut de balance glucocorticoïdes-progestérone a un impact direct sur la tolérance immunitaire maternelle en début de gestation (pouvant mener à une fausse couche), la prématurité et le retard de croissance intra-utérin (Solano ME and Arck PC, 2020). De manière intéressante, l'application de progestérone pourrait prévenir les fausses couches chez certaines patientes à risques (Haas et al. 2019, Devall et coll. 2021).

PLGF (PLacental Growth Factor)

De la même manière, le PLGF est un facteur de croissance placentaire sécrété par le syncytiotrophoblaste au cours de la grossesse. Cette glycoprotéine impliquée dans la voie de signalisation du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), joue un rôle dans l'angiogenèse placentaire. Le PLGF possède quatre isoformes (PLGF1-4) qui peuvent être synthétisées par différents organes : le cœur, les poumons, le tissu adipeux, etc. Au cours de la grossesse le placenta sécrète majoritairement le PLGF du côté maternel, avec des concentrations allant de 20ng/mL de sang (au premier trimestre) à 500ng/mL atteignant un plafond vers 30SA puis diminue jusqu'au terme. En comparaison les concentrations circulantes fœtales sont de quelques dizaines de ng/mL tout au long de la grossesse (Lecarpentier E. et al. 2015). Le PLGF placentaire joue un rôle important dans le développement du fœtus, la migration et la prolifération cellulaire ; il joue également un rôle important dans la mise en place de réseau neuronal cortical (Lecuyer et al. 2017). En effet, le docteur Lecuyer et son équipe ont pu mettre en évidence sur un modèle murin que les taux de PLGF placentaires étaient diminués par l'alcool au cours de la gestation, entraînant une désorganisation du réseau corticale chez le fœtus. De manière encore plus intéressante, ce phénomène était réversible avec la surexpression de PLGF *in utero*.

Son rôle dans l'angiogenèse dépend de la biodisponibilité de son récepteur VEGFR1 (ou FLT1) et de son affinité de liaison à son récepteur soluble. Le sFLT1 (soluble fms-like tyrosine kinase ou VEGFR1), qui est la forme soluble, circulante du récepteur VEGFR1,

est une glycoprotéine sécrétée dans la circulation maternelle par les cellules endothéliales vasculaires et le trophoblaste (500ng/mL au premier trimestre à 2000ng/mL au troisième trimestre).

Le PLGF et son récepteur soluble le sFLT1 sont respectivement deux molécules pro et anti angiogéniques et font partie d'une balance finement régulée tout au long de la grossesse par le placenta (Lecarpentier E et al. 2015).

Lorsqu'elle est dérégulée, cette balance est la cause de nombreuses pathologies dont la prééclampsie qui elle-même peut être un facteur de risque de prématurité, de mort *in utero* ou de complications post natales (Tableau 3, Poon Liona C et al. 2019).

Tableau 3 *Complications néonatales et périnatales relatives à la prééclampsie, modifié d'après Poon L.C. et al. 2019*

COMPLICATIONS A COURT-TERME	COMPLICATIONS A LONG TERME
Retard de croissance intra-utérin (RCIU)	Paralysie cérébrale
Oligo hydramnios	QI inférieur à la moyenne nationale
Mort intra-utérine	Perte d'audition
Prématurité	Atteinte oculaire
Score Apgar faible	Insulino-résistance
FCF (fréquence cardiaque fœtale) non rassurante durant le travail	Diabète de type 2
Admission en service de néonatalité requis	Maladies artérielles
	Hypertension

Neuropeptides et neurohormones placentaires :

De manière générale, les neuropeptides sont des peptides synthétisés au niveau des neurones qui transportent une information. Ce sont des neuro-messagers cellulaires synthétisés et libérés majoritairement par l'hypothalamus. Ces neuropeptides sont synthétisés puis encapsulés dans des vésicules d'exocytose et transportés à la membrane. Les neuropeptides sécrétés ont la particularité de pouvoir atteindre n'importe quelle cible cellulaire *via* la circulation sanguine. Une fois la cible atteinte, le neuropeptide peut délivrer une information qui peut conduire à une modification structurelle, comportementale, pouvant induire des modifications en chaîne susceptibles d'impacter un type cellulaire, si ce n'est tout l'organisme. Les neuropeptides, en transmettant une information à l'ensemble d'une population cellulaire peuvent ainsi être considérés comme des neurohormones (Ludwig, 2015).

Dans une revue littéraire de 1991, Petraglia et son équipe ont mis en évidence deux neuropeptides placentaires, impliqués dans le travail au terme de la grossesse : la corticolibérine (ou CRH pour corticotropin-releasing hormone) et le neuropeptide Y (NPY) (Petraglia et al. 1991). En 2001, une revue de Reis et al. a permis de regrouper 43 neurohormones placentaires (Reis et al. 2001). Parmi celles-ci, 20 sont des neuropeptides. Il s'agit de : la somatostatine, la neurotensine, la mélatonine, l'urocortine, l'angiotensine, l'endothéline, la substance P, la cholécystokinine, la met-encéphaline, les dynorphines, la galanine, les peptides reliés au gène de la calcitonine, le peptide auriculaire natriurétique, la rénine, le peptide intestinal vasoactif, l'hormone gonadolibérine, l'hormone de libération de l'hormone de croissance GHRH, l'hormone thyrotrope, la CRH et le NPY. Les 13 autres étant des protéines, des neuro-stéroïdes et des monoamines. Dans cette revue, l'auteur décrit le rôle de certaines de ces neurohormones et particulièrement leurs effets endocrines, paracrines et autocrines et leur rôle au niveau de la régulation de tout le système endocrine placentaire. Il décrit notamment le rôle de 2 neuropeptides majeurs : la CRH, le NPY.

La corticolibérine (CRH), d'abord mise en évidence pour son rôle dans la libération de l'hormone adrénocorticotrope par l'hypophyse (Vale et al. 1981), a ensuite été étudiée pour son rôle majeur lors du travail de l'accouchement mais également au niveau du placenta tout au long de la grossesse (Reis et al. 2001, King et al. 2001). Notamment il a été démontré, sur une cohorte de 500 femmes, que des taux élevés de CRH placentaires étaient associés à des taux élevés de prostaglandines, et pouvaient initier une cascade d'évènements conduisant à la contraction des muscles lisses utérin (Smith et al. 2009). La CRH, localisée principalement au niveau de la couche de ST, va être sécrétée progressivement tout au long de la grossesse jusqu'à son pic au terme de la grossesse. L'hormone peut se fixer à deux types de récepteurs : CRF-R1 (majoritairement au niveau des ST) et CRF-R2 (présent également au niveau des CTV). Plusieurs études se sont intéressées au rôle de la corticolibérine placentaire dans la mise en place du cerveau fœtal. En 2001, une étude de Brunson sur un modèle murin, a permis de mettre en évidence que l'exposition à de la CRH exogène en période postnatale précoce pouvait conduire à des dysfonctionnements d'apprentissage, une perte de cellules hippocampiques et une altération de la mémoire (Brunson et al., 2001). Également il a été démontré que la CRH placentaire pouvait réguler la neurogenèse fœtale (Koutmani et al., 2013). Enfin, en 2016, une étude de Howland et al., menée sur une cohorte de 89 femmes

et 91 enfants, a démontré qu'une élévation de pCRH non physiologique pendant la grossesse était associée à un symptôme d'intériorisation de l'enfant vers 5ans, prouvant ainsi l'existence d'une programmation cérébrale fœtale durable dans le temps par la pCRH prénatale (Howland et al. 2016).

Le neuropeptide Y est un peptide composé de 36 acides-aminés sécrété au niveau du cerveau, du système cardiovasculaire, du système respiratoire, au niveau gastrointestinal, au niveau du tissu adipeux et au niveau du tractus génital. Pendant la grossesse, les NPY sont retrouvés dans la décidue maternelle, les membranes fœtales et le placenta au niveau des cytotrophoblastes villositaires majoritairement (Petraglia et al. 2016, Petraglia et al. 2019). Les NPY possèdent 3 isoformes (d'une forme complète à une forme tronquée) et peuvent se lier à 6 récepteurs (Y1R->Y6R). En dehors de la grossesse, la sécrétion de NPY, par différents tissus, est associée à la prise alimentaire, l'inhibition de la sécrétion d'insuline, la régulation de la motilité intestinale et des sécrétions gastrointestinales et rénales mais aussi à l'inhibition de l'anxiété (Grove and Smith, 2003 ; Pedrazzini et al., 2003 ; Petraglia et al. 2019). Dans le cas d'une grossesse, les taux de NPY élevés sont retrouvés au terme de la grossesse et associés à l'ouverture du col utérin (Petraglia et al. 1989). En 2019, une étude de Klinjampa et al. ont montré, sur une cohorte de 44 femmes (22 femmes ayant eu une grossesse normale et 22 femmes ayant eu une prééclampsie), que NPY placentaire pouvait contribuer à la pathophysiologie de la prééclampsie (Klinjampa et al. 2019). En effet, les auteurs ont montré que l'expression de trois récepteurs de NPY (Y1R, Y2R et Y5R) était significativement diminuée chez les patientes ayant eu une prééclampsie. Enfin, une étude de 2006 sur un modèle murin a mis en évidence un profil d'expression de NPY similaire entre le cerveau fœtal et le placenta, tout au long de la gestation, suggérant l'action du NPY placentaire au niveau du développement cérébro-fœtal et notamment au niveau des voies de signalisation de la prise alimentaire (Beloosesky et al. 2006).

Les neurokinines, découvertes en 1983, sont des neuropeptides de la famille des tachykinines. Trois sont bien connus pour jouer un rôle au niveau du système nerveux central chez l'homme : la neurokinine A, la neurokinine B et la substance P (Regoli et al. 1989). Impliquées dans de nombreuses pathologies (Asthme, côlon irritable, hyperactivité, anxiété, etc.), les neurokinines et leurs récepteurs possèdent différents antagonistes pharmacologiques permettant de traiter ces affections (Jung et Priefer, 2021). Concernant l'état gestationnel, il a été démontré que les neurokinines jouaient un

rôle dans les nausées matinales (Lowry, 2018). Enfin depuis une vingtaine d'années, leur présence dans le placenta au niveau des cellules trophoblastiques a été prouvée (Sawicki, Dakour, Morrish. 2003) et plusieurs études démontrent leur implication dans la prééclampsie et son diagnostic (Sawicki, Dakour, Morrish. 2003 ; Page et al. 2010 ; Parchim et al. 2015).

Fonctions d'échanges et de transports

Outre ce rôle endocrinien, les syncytiotrophoblastes sont également en charge des échanges gazeux (oxygène et dioxyde de carbone) et de nutriments : lipides, acides aminés, glucose. De nombreux échanges transplacentaires se font par diffusion passive. Notamment le placenta, par perméabilité, permet à l'oxygène de passer du sang maternel vers le sang fœtal et au dioxyde de carbone de faire le chemin inverse. Outre ces diffusions passives, différents transporteurs localisés au niveau du syncytiotrophoblaste ou du cytotrophoblaste peuvent faciliter ou diminuer les transferts de molécules entre les compartiments maternel et fœtal. Ainsi la quantité et l'affinité du substrat pour le transporteur va déterminer le passage d'un compartiment à l'autre (Lecarpentier et al. 2015).

Les acides aminés jouent un rôle primordial pour le fœtus que ce soit pour la synthèse accrue de protéines, comme intermédiaires du métabolisme, comme donneur de groupements fonctionnels ou encore pour la synthèse d'amines biogènes (ex : les neurotransmetteurs comme le GABA à partir du glutamate ou la sérotonine à partir du tryptophane). Pour la plupart des acides aminés, leur transport est actif et met en jeu plus d'une dizaine de familles de transporteurs que l'on retrouve au niveau du cytotrophoblaste et/ou du syncytiotrophoblaste.

Les lipides sont également essentiels au développement fœtal. Certains acides gras vont pouvoir être diffusés passivement. Le cholestérol est indispensable pour le développement du fœtus, médiant de nombreuses voies de signalisation du métabolisme et de la croissance cellulaire. Malgré son rôle fœtal très important, la synthèse du cholestérol fœtal est insuffisante. Il est alors capturé dans la circulation maternelle et transporté à travers le placenta. Il pourra ainsi être sécrété dans la circulation fœtale ou transformé en stéroïde par le placenta (Woollett L.A. 2011). La capture du cholestérol se

fait par différentes voies impliquant les LDL, VLDL, HDL et LXR (Huang W. et al. 2019). Une carence en cholestérol fœtal *in utero* peut augmenter le risque d'accouchement prématuré, de microcéphalie et d'insuffisance pondérale à la naissance (Edison R.J. et al. 2007).

Deux grandes familles de transporteurs sont : les ABC transporteurs (pour ATP Binding Cassette transporteurs permettant l'efflux d'une molécule en dehors de la cellule) et les SLC transporteurs pour (Solute Carriers transporteurs permettant l'influx et l'entrée d'une molécule dans la cellule).

Les transporteurs SLC regroupent 300 gènes et comptent 46 sous familles dont les plus présents vont permettre la diffusion facilitée ou le transport actif, entre autres, de sucres, d'acides aminés, de peptides, d'acides gras, de vitamines et de neuromédiateurs (Fredriksson et al. 2008). L'expression de ces transporteurs est ubiquitaire, principalement au niveau des « barrières » biologiques comme le placenta ou la barrière hémato-encéphalique (Thèse de doctorat du Dr Berveiller). Parmi ces transporteurs, une famille essentielle est celle des GLUT (SLC2) qui possède 14 isoformes et qui permet le transport facilité de glucose dans le placenta (Illsley et al. 2020). Plusieurs autres familles (OATP, les OAT, les OCT, les MCT, etc.) sont également essentielles au bon développement du fœtus et sont décrit précisément dans le manuscrit du Dr Berveiller (Thèse de doctorat du Dr Berveiller).

Enfin, certains transferts vont nécessiter l'activation de canaux protéiques (pour l'eau par exemple avec les aquaporines) ou ioniques.

Que ce soit par diffusion passive/ facilitée ou par transport actif, canaux, endosomes, le trophoblaste permet l'ensemble des transferts transplacentaires.

Métabolisme placentaire

Le métabolisme placentaire joue un rôle central dans ces différentes fonctions placentaires puisqu'il permet de générer l'énergie nécessaire à son fonctionnement, entre autres, à la synthèse et la sécrétion d'hormones et aux différents transports indispensables pour la croissance fœtale. Ayant pour rôle primaire d'être un générateur d'ATP il permet également de maintenir l'homéostasie placentaire et de protéger le fœtus en s'adaptant à son environnement au cours de la grossesse.

Afin de répondre au mieux aux besoins énergétiques importants, le placenta va utiliser majoritairement la voie de la glycolyse à partir du glucose capté de la circulation maternelle. La source du glucose la plus disponible sera celle apportée par les transporteurs GLUT. De ce fait, plus de 50% du glucose circulant sera utilisé dans le métabolisme placentaire et pourra être oxydé en pyruvate (Irving L et al. 2020). Le pyruvate peut avoir plusieurs destinées :

- Le pyruvate sera oxydé et décarboxylé en Acétyl CoA par la Pyruvate déshydrogénase (PDH) dans la mitochondrie. L'Acétyl CoA mitochondrial est un produit riche en énergie et le principal substrat du cycle de Krebs et permettant à son tour de fournir les substrats pour la synthèse d'ATP
- le pyruvate sera oxydé en lactate (20%), à la fois pour soutenir le flux glycolytique et éviter une consommation accrue d'O₂ (celui-ci étant principalement transporté vers le compartiment fœtal), et également apporter ce carburant clé pour la croissance fœtale (25% du CO₂ produit par le fœtus vient de l'oxydation du lactate d'origine placentaire).

La glycolyse, qui sert de plaque tournante majeure du métabolisme va permettre de générer différents précurseurs : biosynthèse de protéines, nucléotides, acide-aminés. Celle-ci va également utiliser le glucose circulant pour générer du pyruvate afin qu'il soit transformé en Acétyl CoA par la mitochondrie. L'Acétyl CoA mitochondrial va ainsi soit entrer dans le cycle de Krebs pour fournir de l'énergie, soit servir à la production de cholestérol. Celui-ci peut être clivé par un cytochrome P450 pour permettre la production de son dérivé : la prégnénolone qui pourra ensuite être métabolisée en progestérone. Comme indiqué précédemment, la glycolyse, pour maintenir son flux constant, va consommer le NAD⁺ provenant de la conversion du pyruvate en lactate. La réduction du NAD⁺ en NADH puis sa phosphorylation en NADPH va permettre une meilleure gestion du stress oxydatif (limitation des ROS provenant de la chaîne respiratoire de la mitochondrie) et de ce fait joue un rôle crucial dans l'homéostasie placentaire.

Afin de compenser la demande énergétique soutenue du métabolisme, le placenta utilise des réactions anaplérotiques qui vont permettre de restaurer en continu la concentration des métabolites consommés en excès par le cycle de Krebs sans passer par la formation d'Acétyl-CoA (Irving L et al. 2020). Une des voies prédominantes dans le placenta est celle du glutamate. Les nombreuses études du Dr Xin Wu et son équipe sur un modèle porcin ont montré le rôle primordial des échanges entre le glutamate et la glutamine au niveau du placenta et du foie du fœtus (Wu et al. 2015). C'est un exemple type de coopération et d'échanges inter-organes entre le placenta et le fœtus, permettant un recyclage de la glutamine et du glutamate. La glutamine devient un acide aminé essentiel pendant la grossesse car les besoins fœtaux dépassent largement la synthèse possible. Une désamination de la glutamine dans le foie fœtal est possible, produisant le glutamate. Ce glutamate fœtal est capté à 90% par le placenta et va pouvoir être reconverti en glutamine ou surtout métabolisé en α -cétoglutarate afin de maintenir le flux du cycle de Krebs (Figure 15).

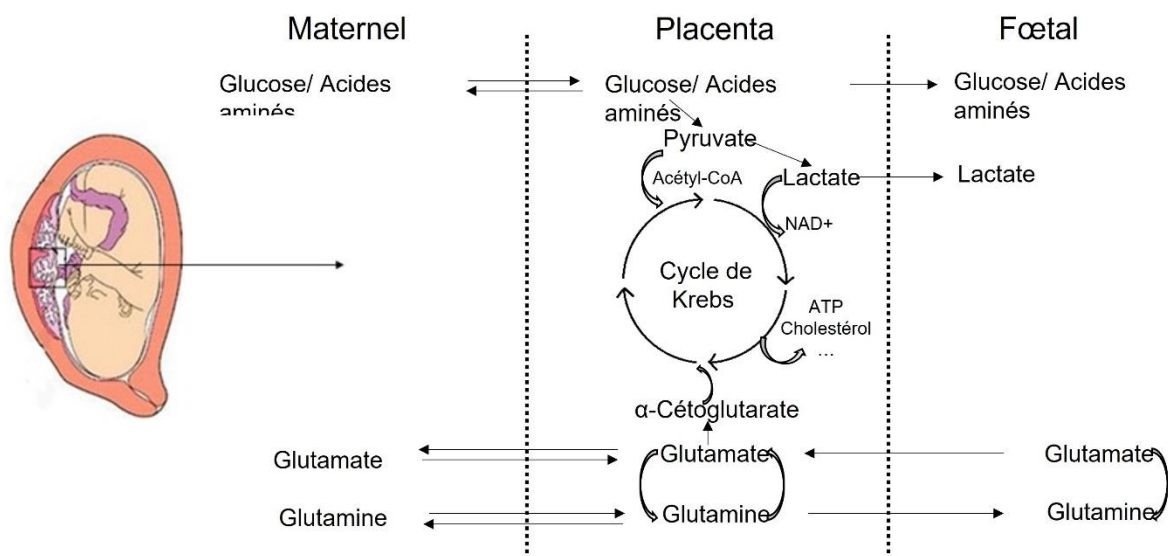


Figure 15 Représentation schématique du métabolisme placentaire, modifié d'après Wu Xin et al. 2015 et Irving et al, 2021

D'autres intermédiaires glycolytiques, soumis à des régulations par voie de signalisation, sont également connus comme régulateurs mitochondriaux c'est le cas de la voie des kinases MAPK (Mitogen-activated protein Kinase) étroitement liée à celle de mTOR (mammalian target of rapamycin). La voie mTOR serait mise en avant pour agir au niveau placentaire comme un « capteur nutriments ». Cette voie de signalisation serait un mécanisme par lequel le transport de la glutamine et du glutamate serait modulé dans des conditions physiologiques pour assurer une balance énergétique optimale. La voie MTOR assure également différents rôles majeurs dans la signalisation cellulaire du placenta.

Tous ces processus métaboliques possèdent un rôle primordial dans les fonctions physiologiques du placenta et leur dérégulation mène à des défauts placentaires qui peuvent conduire à des pathologies gestationnelles. Par exemple, un dysfonctionnement du métabolisme mitochondrial placentaire, du processus de glycolyse, de synthèse d'ATP ou de transport des nutriments est observé dans les cas de la prééclampsie (avec par exemple une production en excès de ROS et un RCIU) (Irving et al. 2020).

Longtemps considérées comme « barrière » vis-à-vis d'un certain nombre de médicaments et toxiques, nous savons désormais que le placenta est avant tout un organe d'échanges. La protection du fœtus et son développement sont ainsi assurés soit par la fonctionnalité de transporteurs d'efflux, soit par la métabolisation placentaire limitant l'accumulation dans le compartiment fœtal.

Qu'en est-il du rôle de protection du placenta face à l'alcool ?

Métabolisation fœto-placentaire de l'alcool

On sait aujourd'hui que l'alcool passe librement du sang maternel vers la villosité placentaire et ce par diffusion passive permettant ainsi à l'alcool de rejoindre la circulation fœtale. Le fœtus ne possède un système d'excrétion et de métabolisation par l'alcool déshydrogénase qui n'est efficace que de 5 à 10% par rapport à celui d'un adulte (Pikkarainen PH, 1971). Cela sous-entend que seul le placenta peut assurer un rôle protecteur et limiter l'atteinte fœtale.

Dans le cas d'une alcoolisation, il n'existe à ce jour que très peu d'articles qui étudient le métabolisme de l'alcool placentaire. Tous s'accordent à penser que l'ADH, malgré sa présence dans le placenta, n'est pas l'acteur principal de la métabolisation de l'alcool mais qu'il s'agirait de CYP2E1. Ce cytochrome P450, impliqué dans la métabolisation des acides gras, est retrouvé dans le placenta mais aussi chez le fœtus au niveau du foie et du système nerveux central. Sa faible concentration fœtale *in utero* explique en partie les effets de l'exposition prolongée du fœtus à l'alcool. De surcroît, l'oxydation de l'éthanol par CYP2E2 va produire des ROS entraînant un stress oxydatif important dans le système nerveux central du fœtus (Gemma et al. 2007) pouvant être responsable de défaut à long terme chez l'enfant.

On comprend alors aisément comment l'alcool peut avoir un impact aussi considérable sur le développement du fœtus et ce, peu importe le stade de développement auquel il est exposé.

Alcool, placenta et développement cérébral fœtal

Le placenta, principale source de sécrétion hormonale au cours de la grossesse, n'est étudié dans le cadre d'une exposition à l'alcool que depuis quelques années. Comme décrit précédemment, l'équipe du Dr Bruno Gonzalez a étudié l'impact de l'alcool sur le PLGF et son rôle dans l'angiogenèse cérébrale associée à l'alcoolisation *in utero* et plus particulièrement au niveau de la vascularisation corticale chez un modèle murin et humain. En présence d'alcool, les taux de PLGF circulants dans le placenta sont diminués chez la souris entraînant directement une désorganisation des vaisseaux corticaux et une dépolarisation des neurones chez les fœtus (Lecuyer M et al, 2017) démontrant l'existence d'un axe placenta-cerveau au cours de la gestation (Figure 16).

Cette preuve de la présence d'un tel axe permet de remettre en perspective toutes les recherches sur l'effet de l'alcool sur le cerveau fœtal et sur les troubles causés par l'alcoolisation fœtale, notamment au regard des effets de l'alcoolisation *in utero* sur les déficits de l'attention et les troubles de l'hyperactivité. A ce stade, il est important de souligner que si le placenta est un organe endocrine, il est également un organe sécrétant de nombreux neuromédiateurs alors qu'il s'agit d'un organe non innervé.

De nombreuses études ont permis de démontrer le rôle du glutamate et du GABA, ainsi que leurs récepteurs respectifs, dans les mécanismes des TDAH (troubles du déficit de l'attention et de l'hyperactivité) (Dunn Geoffrey A. et al. 2019). Or l'importance du glutamate dans le placenta a été largement étudié dans la littérature (Manta-Vogli Penelope D. et al. 2020). Les nombreuses études du Dr Xin Wu et son équipe sur les cochons ont montré le rôle primordial des échanges entre le glutamate et la glutamine, au niveau du placenta et du foie du fœtus (Figure 15, Wu et al. 2015). Impliqué dans de

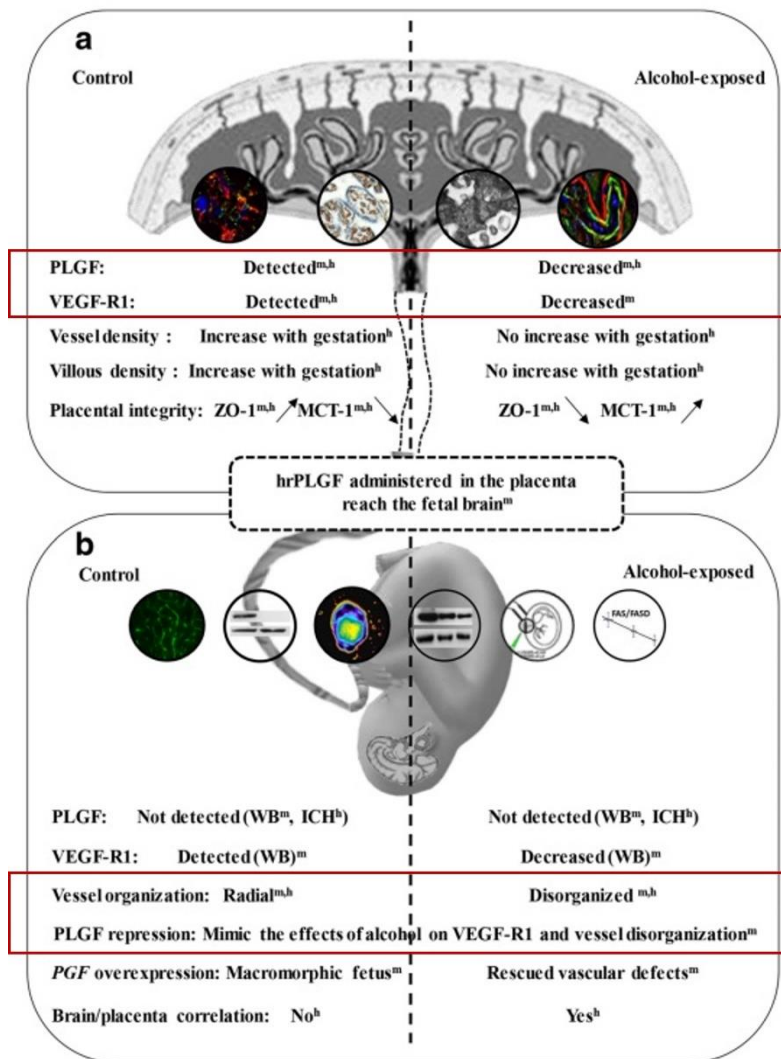


Figure 16 Résumé des effets de l'alcool in utero sur le placenta et le cerveau fœtal de souris (Lecuyer M. et al. 2017). a) correspond aux effets observés dans le placenta exposé ou non à l'alcool in utero. b) correspond aux effets observés dans le cerveau fœtal post délivrance, exposé ou non à l'alcool in utero (en lien direct avec les effets observés dans le placenta).

nombreuses fonctions physiologiques (carburant métabolique, substrat, précurseur de neurotransmetteurs, etc.) le glutamate peut, lorsque son taux est fortement augmenté, devenir neurotoxique pour le fœtus. A l'inverse il peut être réduit et conduire à des retards de croissance intra utérin (McIntyre Kirsty R. et al. 2020). De plus, en s'intéressant aux mécanismes impliqués dans la mise en place des neurones au cours de la grossesse, il en ressort que les récepteurs glutamatergiques AMPA/kainate et GABAergiques semblent jouer un rôle clé dans ces mécanismes (Herlenius, Lagercrantz, 2004 & Poluch & König, 2002). Et de manière intéressante, en 2013, une équipe a prouvé qu'une alcoolisation *in utero* chez un modèle ovin, altérait fortement le taux de glutamate (Washburn et al. 2013). En effet les résultats mettaient en évidence une acidémie du sang de la mère et du fœtus à la suite d'une alcoolisation *in utero* qui pouvait être atténuée par l'administration d'une

dose unique de glutamine en même temps que l'alcool. L'intérêt d'étudier le placenta dans le cadre de la dépolarisation des neurones médiée par le glutamate semble alors évident.

En 2019, l'implication des voies de signalisation accessoire MAPK et mTOR a été démontré dans la sévérité des troubles du spectre autistique (Rosina et al. 2019). Ces voies de signalisation, hautement conservées, jouent un rôle majeur dans le métabolisme placentaire mais aussi dans la signalisation cellulaire et la régulation du développement fœtal. Leur dérégulation est associée à des défauts synaptiques et une désorganisation neuronale pouvant induire des troubles du développement cérébral ou des pathologies neurocomportementales à plus long terme (spectre autistique, schizophrénie, addiction, dépression) (Costa-Mattioli M. Monteggia L.M, 2013). Par ailleurs, des travaux ont mis en évidence le rôle de la voie mTOR dans la régulation des neurones GABAergiques POMC (pro-opiomélanocorine) et leurs neurotransmetteurs (Saucisse N. 2016) ; Le rôle de ces neurones dans la régulation de la prise alimentaire est bien décrit mais ils possèdent également un rôle dans la réponse au stress, l'hyperactivité, les fonctions du système immunitaire et la régulation du système limbique (Toda et al. 2017, Govorko et al. 2012). Fait intéressant, les anomalies du système POMC sont associées à la consommation d'alcool, que ce soit en termes de conséquences (addiction chez l'adulte) ou en termes de causalités (exposition à l'alcool *in utero* qui induit une défaillance du système POMC conduisant directement à une hyperactivité, du diabète et un risque d'obésité). Les méthylations de l'ADN qui en résultent sont transmissibles de manière sexe dépendante chez un modèle murin (Govorko et al. 2012). Lors d'une consommation d'alcool il a été démontré qu'il existait une activation d'un sous ensemble de neurones POMC du noyau arqué, se projetant majoritairement vers l'amygdale, permettant ainsi d'activer des systèmes de récompense pouvant contribuer à la surconsommation d'alcool. Ainsi ces résultats permettent d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques pour les troubles liés à la consommation d'alcool (Leyrer-Jackson, Hood and Olive. 2021). Au-delà de son influence sur les neurones POMC, il a été observé qu'une hyperactivation de mTOR menait à des troubles psychiatriques chez les adolescents en impactant les neurones GABAergiques (Hui et al. 2019).

L'émergence de ces travaux sur l'implication du placenta dans le développement du cerveau fœtal a permis d'ouvrir la voie sur un nouveau domaine d'étude : la neuroplacentologie (Vacher et al. 2021). Avec les différentes preuves de l'existence de cet

axe (Rosenfeld et al. 2020), la question de l'implication du système endocrinien induite par l'étude du Dr Lecuyer en 2017 pose des questions sur tout du système hormonal du placenta (Lecuyer M et al. 2017). Outre la balance PLGF/sFLT1 impliqué dans l'alcoolisme fœtal, d'autres hormones pourraient être de bons candidats comme biomarqueurs d'alcoolisation fœtale. Des études sur le lien direct entre le spectre autistique des nourrissons et les hormones de grossesses (hCG, PPAP α , stéroïdes) (Tsompanidis et al. 2021) et l'étude de 2016 sur l'implication de la dérégulation de l'hCG dans les pathologies de grossesses (Sirikunlai et al. 2016) permettent de se poser la question de l'impact de l'alcool sur l'ensemble de la fonction endocrine de placenta.

Alors même que tout laisse à penser que le placenta est lié directement aux effets de l'alcool *in utero* le nombre de publication en ce sens n'atteint à peine qu'une centaine d'études toutes espèces confondues. Et pour ce qui est du placenta humain, ce nombre est réduit à quelques dizaines. Au vu du rôle primordial de nombreux acide aminés et hormones dans la mise en place des organes fœtaux mais aussi dans le fonctionnement du placenta il devient nécessaire d'aller étudier l'impact réel de l'alcool sur le placenta humain, sa fonction endocrine et sécrétrice mais aussi sa capacité métabolique et ses fonctions d'échanges.

Afin de pallier le manque de connaissance sur l'impact de l'alcool au cours de la grossesse sur le placenta humain, réservoir potentiel de biomarqueurs d'alcoolisation *in utero*, ainsi que le potentiel retentissement sur la vie de toute l'individu exposé, ce projet de thèse s'inscrit dans le projet plus global ALCOBRAIN ; Ce dernier, en collaboration avec différents acteurs en Bretagne et en Ile De France, fait l'objet de financements de l'Agence Nationale de la Recherche et de la Fondation de France.

Comme nous l'avons décrit, l'alcool peut avoir un impact extrêmement toxique sur le cerveau fœtal et le placenta semble jouer un rôle clé dans le développement du fœtus et tout particulièrement le développement cérébral. Il reste à mettre en relation le lien entre ces trois acteurs majeurs : alcool/placenta/cerveau fœtal. Les études concernant l'impact réel de l'alcool sur le placenta humain et ses fonctions deviennent alors primordiales. Plus encore la caractérisation de biomarqueurs d'alcoolisation au cours de la grossesse, sensibles, quelle que soit la dose, l'intervalle et le moment de l'ingestion d'alcool pendant la grossesse permettrait de prendre en charge plus précocement les enfants atteints de TCAF.

Les objectifs de ces travaux de recherche ont donc été :

- 1) De mettre en évidence le Syndrome d'Alcoolisme Placentaire (SAP)
- 2) D'étudier la neuroplacentologie humaine dans un contexte d'alcoolisation *in utero*
- 3) De caractériser des biomarqueurs placentaires d'alcoolisation au cours de la grossesse

Matériel et méthodes

Patientes, consentement et prélèvements

La réalisation de ce travail de thèse a nécessité le recueil de différents prélèvements placentaires de patientes ayant consommé ou non de l'alcool au cours de leur grossesse. Ces prélèvements du premier trimestre (Interruptions Volontaires de Grossesse) ou du 3e trimestre (grossesses menées à terme) ont permis d'avoir la possibilité d'étudier l'effet de l'alcool *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro*.

Différents hôpitaux de l'Île-de-France ont permis l'accès aux recueils placentaires notamment différents CHU de l'Assistance Publique des Hôpitaux de Paris :

- La maternité de Port Royal (centre hospitalier universitaire Cochin),
- le Centre Hospitalier Universitaire Antoine Béchère,
- le Centre Hospitalier Universitaire Robert Debré,
- le Centre Hospitalier Universitaire de Tenon

Et plusieurs centres privés :

- Hôpital Privé d'Antony,
- Institut Mutualiste de Montsouris,
- Clinique privée des Diaconesses

L'ensemble de ces maternités a permis de mettre en place les différentes expérimentations sur plus d'une soixantaine de prélèvements (dont n= 26 placentas de premier trimestre, n=45 placentas témoins, n=6 placentas Alcool).

Chaque prélèvement a fait l'objet d'un consentement éclairé INSERM de la part de la patiente (CPP 2015-mai-13909 ; CNIL 1848687) pour les prélèvements de premier et troisième trimestre et un consentement de l'APHP juin 2018 (UF d'orthogénie et de la planification familiale- service de gynécologie, maternité Port-Royal) pour les prélèvements de 1^{er} trimestre.

Profil des patientes

Patientes « témoins » ayant accouché à terme

Critère d'inclusion des patientes

Les placentas témoins servant aux expérimentations *in vitro* (culture primaire et explants placentaires) sont issus majoritairement de femmes ayant accouché par césarienne programmée au terme de la grossesse. Sur la totalité des placentas à terme pour ces expérimentations, seulement 3 placentas sont issus de patientes ayant accouché par voie basse, afin de les comparer aux patientes ayant consommé de l'alcool et ainsi ôter le biais de délivrance en comparant les résultats *in vitro* avec les patientes césarisées.

Pour les expérimentations *ex vivo* (perfusion placentaire), les placentas sont tous récupérés par le CIC de la maternité de Cochin-PORT ROYAL, et perfusés dans le laboratoire du plateau technique Placentech® de la fondation PremUp. Tous les placentas utilisés pour la perfusion proviennent de patientes ayant accouché par voie basse.

Elles présentent toutes les caractéristiques suivantes :

- Un IMC (hors grossesse) compris entre 22 et 26
- Une grossesse sans risque obstétrical
- Pas de consommation déclarée de substances toxiques : alcool, drogue, tabac)
- Pas de médicaments déconseillés au cours de leur grossesse (questionnaire de consultation prénatale).
- Des sérologies négatives pour VIH, VHB, VHC
- Une délivrance au terme de la grossesse (entre 37 SA et 41 SA)
- Le fœtus est eutrophe et le bébé a un poids de naissance entre 3010g et 4200g (valeurs en percentile comprises entre 25 et 75).
- La grossesse est simple (pas de grossesse gémellaire)

Recueil

Les placentas sont récupérés dans la demi-heure qui suit la délivrance et sont techniqués au laboratoire dans l'heure qui suit (en fonction du temps de transport entre la maternité et le laboratoire). L'avantage des prélèvements issus de césarienne programmée est la possibilité non négligeable de prévoir à l'avance le type d'expérimentations *in vitro* et de

réaliser, le cas échéant, la culture primaire de trophoblastes sur la journée (5h d'expérimentation minimum).

Les critères d'inclusion des patientes pour la perfusion placentaire *ex vivo* sont détaillés dans la partie « perfusion » de matériel et méthode. Pour cette expérimentation, les placentas sont récupérés par le CIC de la maternité de Cochin-PORT ROYAL, exclusivement, et perfusés dans le laboratoire de la fondation PREM'UP. Tous les placentas utilisés pour la perfusion proviennent de patientes ayant accouché par voie basse.

Patientes « Alcool » ayant accouché à terme

Les patientes ayant consommé de l'alcool ont accouché par voie basse, à l'exception d'une seule patiente. Les placentas « alcool » sont issus de patientes ayant consommé de l'alcool au cours de leur grossesse. Pour ces patientes alcool, aucun critère d'exclusion n'a été retenu.

Différentes informations ont pu être récupérées pour ces patientes par le biais d'un questionnaire en consultation avec une sage-femme addictologue pendant et après l'accouchement :

- Le type de consommation de l'alcool (chronique ou occasionnel/ Alcool fort ou alcool typer bière à faible %vol),
- La quantité d'alcool ingérée et l'arrêt/ la diminution ou non de la consommation au cours de la grossesse
- La prise d'autres substances toxiques ou de substituts médicamenteux,
- Les pathologies propres à la patiente et le cas échéant la présence d'un traitement pendant la grossesse
- Le terme et le mode de délivrance,
- La spontanéité de la mise en travail,
- Le poids du bébé, son sexe et son atteinte ou non par un syndrome particulier (SAF ou autre).

Les informations ci-dessus sont reportées dans le tableau 4.

Tableau 4 – Caractéristiques cliniques des patientes (et leur bébé) incluses dans la collecte de tissus placentaires issus de femmes ayant été exposées à l'alcool in vivo.

Patientes	N° Placenta	AL1	AL2	AL3	AL4	AL5	AL6
	Consommation alcool	Modérée	Forte	Forte	Forte	Modérée	Forte
	Durée/arrêt	Déni de grossesse : arrêt à 26SA	Pas d'arrêt de la consommation	2 verres/ semaine au premier trimestre	Arrêt de la consommation quotidienne mais prise d'alcool 1pinte/semaine + 3 épisodes plus importants d'alcoolisation	Arrêt souhaité/ Prise d'une quantité importante de bière "sans alcool" à 1,2° puis arrêt total à 34SA	Pas d'arrêt de la consommation Episode de binge drinking
	Autres consommation	Pas d'autres consommations	Prise de cannabis stoppé à 8SA	Prise de drogue épisode	2 épisodes de prise d'héroïne	Pas d'autres consommations	Consommation occasionnelle de drogue (cocaïne, du cannabis)
	Pathologies/ traitement		Obésité de grossesse/ bipolarité et lupus traité sous théralithe et plaquenil / Sous lithium le dernier mois de grossesse		Traitement de substitution aux opiacés		Mésusage de benzodiazépine. Traitée sous Seresta et Loxapac
	Accouchement	Voie basse	Voie basse	Voie basse	Voie basse après rupture des membranes	Voie basse	Césarienne après un déclenchement (Fissuration de la poche des eaux à 37SA)
Bébé	Sexe	Garçon	Garçon	Garçon	Garçon	Fille	Garçon
	Terme	38 SA	36 SA	36 SA	34SA	38 SA	38+5 SA
	Poids (g) de naissance et percentile	3145	3250	2590	1875	2200	3650
		49.9	89.07	40.29	18.07	1.06	75
	Syndromes		SAF		SAF/ PAG	RCIU	

Il est à noter que le questionnaire se base sur les comptes rendus des patientes et un dialogue entre la patiente et la sage-femme ; les patientes ayant consommé de l'alcool pendant la grossesse ne sont pas les plus rigoureuses en termes d'estimation de leur consommation ; les consommations sont donc potentiellement sous-estimées.

Le fait de ne pas utiliser de critères d'exclusion nous a permis de récupérer des placentas avec des profils très différents et de fait, de brasser différentes catégories de consommations d'alcool avec ou non arrêt de la consommation au cours de la grossesse. Selon les réponses au questionnaire, les patientes peuvent être divisées en 2 catégories :

- Alcoolisme modéré : principalement consommation d'alcool à faible % d'alcool et de manière non chronique
- Alcoolisme fort : prise chronique d'alcool en grande quantité +/- binge drinking d'alcool fort

Ainsi, il est possible de comparer des placentas de patientes alcooliques qui ont consommé fortement et de manière régulière de l'alcool pendant leur grossesse (avec, pour la majorité des cas, d'autres addictions) avec des placentas de patientes qui ont consommé de l'alcool de manière involontaire et modérée au début de leur grossesse et qui ont arrêté rapidement (alcool seul sans prise d'autres substances toxiques). Effectivement, certaines patientes alcooliques avaient consommé différentes drogues en plus de l'alcool. La récupération de ces prélèvements placentaires de femmes alcooliques a nécessité une autorisation d'accès à la faculté 24/24h car les 6 patientes alcooliques avaient d'emblée choisi un accouchement par voie basse, sans planification de la date et de l'heure d'accouchement. Il s'est avéré que la plupart d'entre elles a accouché pendant la nuit. La mise en place d'un protocole spécifique de sécurité (travail isolé) m'a permis de venir jour et nuit au laboratoire sans risque. Cependant, les mesures sanitaires en place en France au cours des mois de confinements et les mois suivants ont empêché toute récupération de prélèvements de placentas pendant plusieurs mois. De plus, certaines patientes ayant consommé de l'alcool n'ont pas accouché dans la maternité prévue initialement. Toutes ces contraintes nous ont amené à ne pas récupérer des prélèvements placentaires prévus dans la cohorte "Patientes alcool".

Patientes « Premier trimestre »

La période du premier trimestre de grossesse est la plus cruciale en termes de développement et la plus à risque d'exposition aux agents toxiques, tératogènes comme l'est l'alcool. A ce stade de grossesse, les femmes qui ne savent pas qu'elles sont enceintes peuvent consommer de l'alcool de manière involontaire.

Ainsi, la récupération de prélèvements du premier trimestre est indispensable car elle va nous permettre de comparer les effets de l'alcool à ces deux termes (premier et troisième trimestre).

Les prélèvements de placentas du premier trimestre font suite à une interruption volontaire de grossesse entre la 7^e semaine d'aménorrhée (SA) et la 14^e SA. L'IVG peut être pratiquée par aspiration par méthode instrumentale sous anesthésie générale ou sous anesthésie locale (après essai d'interruption médicamenteuse). Les prélèvements sont divisés en deux catégories : les IVG précoces (entre 7SA et 9+5SA) et les IVG tardives (entre 11SA et 14SA). La récupération des prélèvements de premier trimestre se fait à la

maternité de Port Royal et le questionnaire pré établi ne nous permet pas de savoir si le tissu a été exposé ou non à l'alcool (seule la consommation de tabac est indiquée). Ainsi, les prélèvements choisis comme « contrôle précoce » ou « contrôle tardif » dans l'évolution des biomarqueurs sont issus de patientes ne consommant pas de tabac.

Les prélèvements de premier trimestre sont récupérés avec les annexes embryonnaires et nécessitent plus de précaution à la manipulation car il y a peu de tissu trophoblastique et celui-ci est extrêmement fragile.

Techniques de récupération des différents prélèvements

Récupération des produits d'IVG au premier trimestre

L'expérimentation est pratiquée dans un laboratoire de type L2 sous un poste de sécurité manuel (PSM) stérile dans l'heure suivant l'IVG. La totalité du produit d'aspiration est rincé dans du DPBS 1X (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline®) pour éliminer un maximum d'hématies puis la partie placenta est prélevée à la pince et les villosités isolées sont extraites au maximum pour être à nouveau rincées dans une solution de DPBS 1X.

Pour chaque prélèvement, 8 villosités sont plongées dans de l'azote liquide et conservées à -80°C pour des analyses ultérieures (WB, protéome total et méthylome. Également, huit autres villosités sont incubées 24h à 4°C dans une solution de protection de l'ARN (RNAlater®, RNA Stabilization Reagent, RNAlater TissueProtect Tubes and Rnaeasy® Protect Mini Kit) avant de les plonger dans de l'azote liquide et conservées à -80°C pour des analyses transcriptionnelles.

Récupération des prélèvements placentaires au troisième trimestre (Alcool ou témoins)

Les placentas ont été récupérés et techniqués dans les 2h maximum suivant la délivrance pour limiter les atteintes tissulaires. De plus, le délai de recueil des cellules a un impact direct sur la qualité de la culture (explants ou cellules isolées). Pour les techniques de perfusions, cette récupération rapide permet de remettre le placenta en circulation dans un délai minimal (cf. perfusion *ex vivo*) afin de mimer la double circulation materno-fœtale.

Les expérimentations sont toutes pratiquées dans un laboratoire de type L2 et chaque expérimentation est propre à un type d'analyse : *in vitro* ou *ex vivo*.

Quelle que soit l'expérimentation, l'analyse du placenta commence par l'examen macroscopique avec photographie :

- Aspect général du placenta et des cotylédons (stade de coagulation/ calcification/ présences d'amas lipidique)
- Epaisseur du placenta
- Insertion du cordon
- Pesée sans cordon ni membrane

Pour l'ensemble des expérimentations *in vitro*, chaque placenta est disséqué stérilement sous poste de sécurité manuel (PSM). La première étape de la dissection est de retirer la membrane maternelle et de récupérer les cotylédons. Chaque cotylédon est baigné dans 3 bains successifs d'HBSS1X (Hank's Balanced Salt Solution – Gibco®) pour éliminer un maximum d'hématies. Puis chaque cotylédon est ensuite disséqué à nouveau soit dans l'HBSS1X soit dans du DPBS1X, en fonction de l'analyse prévue, afin d'en extraire les villosités choriales isolées. L'ensemble des villosités choriales sont prélevées selon un schéma systématique : proche du cordon, proche du centre, proche du bord et 3 différents endroits du placenta afin de neutraliser l'hétérogénéité placentaire (critères de Mayhew).

Pour chaque placenta, le protocole suivant a été respecté de manière systématique :

- 24 villosités lavées dans de l'HBSS 1X puis plongées directement dans de l'azote liquide et conservées à -80°C : analyses protéiques par WB/ le protéome/ le méthylome,
- 24 villosités lavées dans de l'HBSS 1X puis incubées pendant 24h à 4°C dans une solution de protection de l'ARN (RNAlater®) avant d'être plongées dans de l'azote liquide et conservée à -80°C : analyses transcriptionnelles
- 4 villosités lavées dans du DPBS 1X et incubées 24h à 4°C dans une solution de paraformaldéhyde (PFA 16% sans méthanol Biomedicals™) dilué à 4% dans du DPBS 1X puis conservées dans une solution diluée à 1% PFA à 4°C jusqu'à expérimentation (DL 3mois) : analyses immuno-histologiques.
- 48 villosités lavées dans du DPBS 1X : protocole des explants villositaires (*cf.* p 172 : explants villositaire)

- 20 à 40g de villosités sont lavées dans de l'HBSS 1X et utilisées : protocole de la culture primaire de trophoblastes.

L'ensemble de ce matériel récupéré a pu être utilisé pour différentes techniques d'expérimentation et d'analyses en fonction de l'axe de recherche et de la question posée. Pour plus de clarté, les prélèvements ainsi que les expérimentations effectuées et les analyses produites par type de placentas ont été répartis dans le schéma de la Figure ci-dessous (Figure 17).

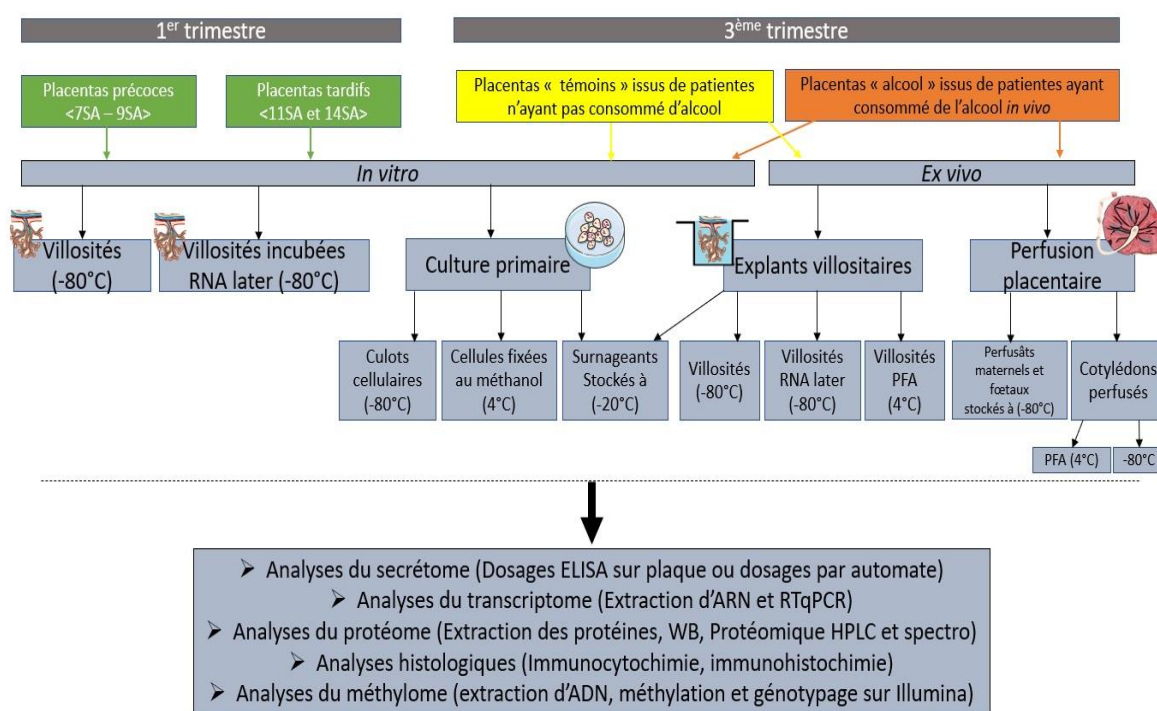


Figure 17 Répartition des prélèvements placentaires du 1er ou troisième trimestre en fonction des expérimentations effectuées sur les différents tissus.

Concentrations d'alcool choisies pour les expérimentations *in vitro* et *ex vivo*

Pour l'ensemble des expérimentations, 2 doses d'alcool *in vitro* ont été choisies. Elles correspondent à des concentrations sanguines qui peuvent être retrouvées et en contact avec le tissu placentaire :

- [0.5g/L] qui représente la limite autorisée par le code de la route pour la conduite en France (et qui est inférieure au seuil d'intoxication défini par l'OMS).

- [2g/L] qui représente une intoxication sévère, retrouvée chez les sujets adeptes du binge-drinking

Les calculs de dilution ont pris en compte la masse volumique de l'alcool. L'alcool utilisé pour mes expérimentations est de l'éthanol absolu à 100% et a été dilué dans le même milieu de culture que la condition contrôle pour chaque expérimentation. Sur les prélèvements de patientes ayant consommé de l'alcool *in vivo*, une exposition *in vitro* a été réalisée afin de nous permettre d'observer l'effet d'une surexposition (effet *in vitro* après une exposition *in vivo*, quel que soit le moment et la durée de cette exposition).

Expérimentations et manipulations avant les analyses

Expériences *ex vivo*

Perfusion placentaire

L'expérimentation est pratiquée directement dans le laboratoire L2 du plateau technique Placentech® de la fondation PremUp. Ainsi, les placentas sont perfusés directement après la délivrance d'après la méthode adaptée de Schneider (Schneider, 1972). Le but de la perfusion est de rétablir la double circulation materno-fœtale du placenta *ex vivo*. Celle-ci sera sous contrôle du pH, de la température et des débits de perfusion. Seulement un cotylédon de chaque placenta sera perfusé. Un circuit semi-ouvert (c'est-à-dire avec une recirculation pendant toute l'expérimentation du perfusé fœtal mais pas de recirculation du perfusé maternel) a été utilisé pour étudier le passage transplacentaire de l'alcool ainsi que son effet sur les sécrétions placentaires.

Préparation du matériel et design de l'étude

La chaîne de perfusion est composée d'un bain-marie à 39°C dans lequel baignent deux flacons contenant les solutions de perfusion maternelle et fœtale, agitées en permanence par des agitateurs magnétiques. Dans le cadre de cette étude, les différentes solutions étaient composées comme indiqué dans le Tableau 5.

Tableau 5 Composition des solutions utilisées pour la perfusion ex vivo des placentas

Conditions	Perfusat	Earle® Balance Salt solution (sulfate 10x)	Antipyrine C11H12N2O [40g/L]	Ethanol
Placentas « Control »	Fœtal	300mL	/	/
	Maternel	1300mL	650µL	/
Placentas « 2g/L »	Fœtal	300mL	/	/
	Maternel	1300mL	650µL	3291µL

Pour chaque perfusion, le pH des solutions est fixé à 7.4 ± 0.1 pour la solution maternelle et 7.2 ± 0.1 pour la solution fœtale (à l'aide de 2 correcteurs de pH : NaOH (Hydroxyde de Sodium) et HCL (Acide Chloridrique)). Grâce à une pompe péristaltique, les débits sont fixés à 12mL/min pour le débit maternel et 6mL/min pour le débit fœtal et permettent une perfusion à la fois du côté maternel et du côté fœtal, reproduisant les conditions physiologiques.

Mise en route de la perfusion

Une fois le placenta récupéré, il est pesé et les membranes retirées. Une analyse macroscopique est effectuée afin de repérer l'intégrité d'un cotylédon que l'on souhaite perfuser. La première étape de perfusion est de trouver une artère chorale et sa veine associée puis de poser le cathéter dans l'artère et la veine et les maintenir grâce à une aiguille et du fil Vicryl rapide 2/0. La pompe péristaltique est mise en route afin de laver rapidement le cotylédon, ce qui permet de l'identifier et de s'assurer de son intégrité. Le retour veineux est immédiatement vérifié du côté fœtal et contrôlé pendant toute la durée de la perfusion.

A cette étape, le placenta est retourné et posé face maternelle vers le haut dans la chambre de perfusion à 37°C. On peut ainsi planter un cathéter à 3 têtes dans le cotylédon qui a «

blanchi » et lancer la pompe péristaltique du côté maternel. L'ensemble de ces éléments est légendé dans la photo de la Figure 18.

Approche *ex vivo* par le modèle de perfusion placentaire

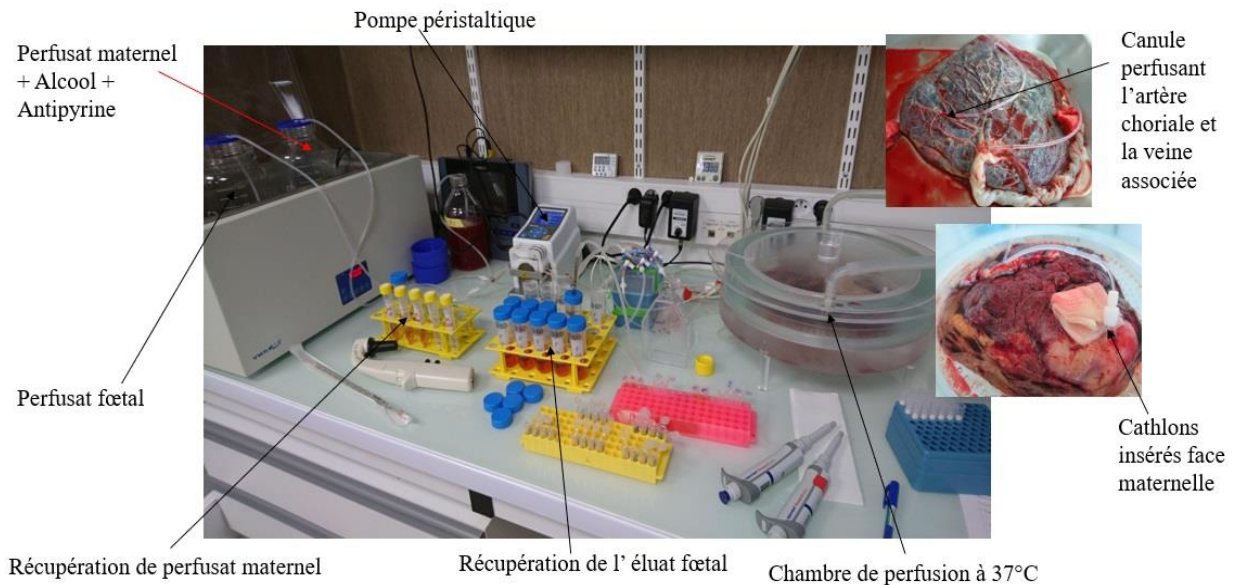


Figure 18 Poste de travail pour la perfusion placentaire. La chaîne de perfusion est composée d'un bain marie chauffant les 2 solutions de perfusat fœtal et maternel. Celles-ci sont acheminées au placenta par des tubulures et le débit est contrôlé par la pompe péristaltique. La chambre de perfusion placentaire est chauffée à 37°C, le placenta y est déposé face fœtale perfusée vers le bas et face maternelle cathélonée vers le haut. Les éluats fœtal et maternel sont récupérés dans différents tubes.

Une fois la perfusion mise en route, la chambre de perfusion fermée et les débits vérifiés, des fractions sont prélevées au niveau du compartiment maternel et de la veine fœtale. Du côté maternel, 3.5mL sont récupérés toutes les 10min jusqu'à 60min puis toutes les 15 minutes jusqu'à 2h (fin de la perfusion). Du côté fœtal, l'intégralité de l'éluat a été récupéré et réparti de cette manière :

- Toutes les 5min pendant 30min, puis toutes les 15min pendant 1h30, l'éluat est récupéré pendant 1 minute pour les dosages (Antipyrine et alcool)
- Pour les 4 minutes restantes des premières 30min, la totalité de l'éluat est récupéré dans un seul Falcon de 50mL
- Dès 30 minutes et jusqu'à 120 minutes (fin de la perfusion), un volume d'éluat écoulé pendant 5min (environs 30mL) est récupéré toutes les 15 minutes dans un Falcon de 50mL.

L'ensemble de l'éluat fœtal a été centrifugé et concentré en vue des études du secrétome. Des contrôles de fonctionnalité placentaire sont réalisés avec une cinétique de la consommation en glucose et de sa transformation en lactate au cours de la perfusion. A la fin de la perfusion, le cotylédon sera lavé au DPBS 1X, disséqué. Une partie sera conservée dans du PFA 4% à 4°C 24h puis dans du PFA 1% jusqu'à utilisation pour de l'immunohistochimie ; L'autre partie sera stockée à -80°C. Les perfusats maternels et élus fœtaux seront utilisés pour l'analyse du secrétome.

Validité de la perfusion

L'antipyrine (ATP) est dosée en HPLC par détecteur ultraviolet (HPLC-UV) sur la plateforme Placentech® de la fondation PremUp ;

Le taux de transfert fœtal (TTF) est calculé par la formule suivante :

$$TTF = \frac{\text{Concentration ATP Foetale}}{\text{Concentration ATP maternelle}} \times 100$$

Le TTF permet d'évaluer le passage transplacentaire de l'antipyrine et ainsi de valider l'expérience. L'expérience est validée si le $TTF \geq 20\%$.

Tous les placentas analysés, qu'ils aient été perfusés par une solution « alcool » ou non, ont été validés par le TTF de l'antipyrine.

Faute d'accès illimité à la chaîne de perfusion de la fondation jour et nuit, les prélèvements issus de patientes ayant consommé de l'alcool n'ont pas pu être étudiés pour la perfusion.

Expériences *in vitro*

Explants villositaires

Après dissection, les villosités qui serviront pour les explants villositaires sont lavées dans du DPBS 1X. Toutes les villosités sont ensuite incubées dans une plaque 24 puits stérile avec couvercle (une villosité/ puit) dans 2 mL de milieu de culture « contrôle » (DMEM (ThermoFisher Scientific™ 11880) (1X) ([+]1g/L D-Glucose [+] pyruvate [-] L-Glutamine [-] Rouge de phénol) + 10% Sérum de veau fœtal CVFSVF00-01 Euro bio©, + 1% GlutamMAX™ (100X) (Gibco© 35050-061), +1% de Pénicilline / streptomycine 15140-

122 Gibco®). Pour chaque placenta, 2 boîtes, chacune avec 24 explants villositaires sont préparées. Les plaques sont incubées à 37°C, 5% CO₂ et le milieu des explants est changé et récupéré chaque jour pendant 6 jours à heure fixe. Pour ce faire, les milieux d'incubation sont prélevés directement dans les puits et poolés par condition (ex : « contrôle 24h »). Les tubes poolés sont centrifugés pour éliminer les débris cellulaires/hématies et le surnageant est réparti par volume de 1mL dans des tubes à hémolyse. Les tubes sont ensuite conservés à -20°C jusqu'à dosage (hormones/stéroïdes). Du nouveau milieu complet est remis dans les puits pour 24h et ainsi de suite jusqu'au traitement des explants à 6 jours. Au 6^e jour, les explants villositaires ont été traités :

- Une boîte pour 24h d'incubation (J7)
- Une boîte pour 48h d'incubation (J8)

Le choix du traitement au 6^e jour a été fait suite à une analyse de la sécrétion d'hCG (témoins du renouvellement du tissu trophoblastique) et de la LDH (témoins de mort cellulaire) sur 10 jours de culture des explants villositaires de n=4 placentas à terme. Cette cinétique a montré un renouvellement du syncytium à J6.

Pour les prélèvements de premier trimestre, l'analyse (n=4 placentas IVG) a montré un renouvellement plus rapide du syncytium dès J4 ; le traitement des explants villositaires de premier trimestre est donc réalisé à J4, la récupération de la boîte 24h de traitement à J5 et de la boîte 48h de traitement à J6.

Chaque boîte comprend 3 conditions (8 explants par condition) :

- « contrôle » : milieu complet (décrit précédemment)
- « Alcool [0.5g/L] » : milieu complet + [0.5g/L] d'éthanol pur
- « Alcool [2g/L] » : milieu complet + [2g/L] d'éthanol pur

Les explants villositaires sont répartis tels que le décrit la Figure 19. A J7 la plaque 24h de traitement est récupérée, puis J8 la plaque 48h de traitement. Par condition, les surnageants sont récupérés et poolés par condition (centrifugés puis conservés à -20°C jusqu'au dosage), trois villosités seront plongées directement dans l'azote liquide et conservées à -80°C (pour les analyses protéomique ou méthylo-mique) ; trois villosités seront incubées 24h dans du RNA Later à 4°C avant d'être plongées dans de l'azote liquide et conservées à -80°C (pour les analyses transcriptionnelles), et enfin deux villosités

seront incubées dans du PFA 4% pendant 24h avant d'être conservées dans du PFA 1% à 4°C (pour l'immunohistochimie).

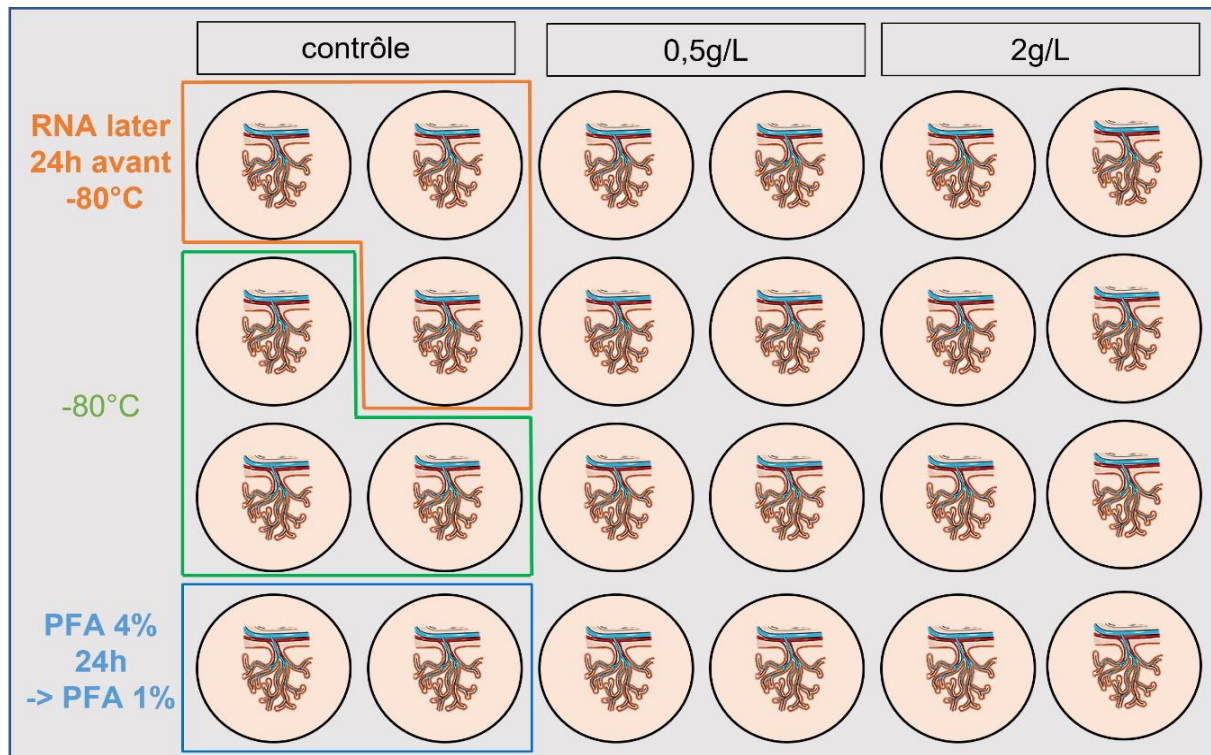


Figure 19 – Répartition schématique des explants villositaires dans la boîte 24 puits. 3 conditions ont été étudiées (contrôle (SVF), 0.5g/L (SVF+ [0.5g/L] EtOH) et 2g/L (SVF +[2g/L] EtOH)). Pour chaque condition, une fois le traitement terminé les villosités ont été conservées comme décrit sur le schéma en vue d'analyses fonctionnelles.

Culture primaire

Une fois disséquées, les villosités issues du placenta sont récupérées et centrifugées. Le surnageant est éliminé afin de peser les villosités (20 à 40g de villosités sont utilisées pour la récupération des CTV) qui seront soumises à une digestion dans une solution enzymatique (HBSS1X + trypsine (0,2%) (Trypsin 1 :250 Gibco 27250-018), supplémentée en calcium (CaCl₂ 0,1M), magnésium (MgSO₄ 0,1M), lait demi écrémé bio stérile (4%) et Dnase (0,03%)) à raison de 5mL/g de villosités obtenues. Les villosités sont digérées au bain-marie à 37°C une première fois pendant 30 minutes puis 20 minutes pour la 2^e digestion et enfin 10 minutes pour les digestions suivantes (8 digestions maximum en tout) en changeant la solution enzymatique à chaque fois. Les digestions sont suivies en prélevant un peu de solution avec quelques villosités afin d'observer au microscope optique l'avancement de la digestion, c'est-à-dire le détachement des CTV. A partir du moment où les CTV sont visibles dans le milieu, les surnageants sont récupérés et

transférés dans différents tubes de 50mL contenant préalablement chacun 1% de sérum de veau fœtal afin de stopper l'action de la trypsine (*SVF de-complémenté Sigma*®). Une fois les digestions terminées, les villosités sont rincées dans de l'HBSS 1X à 37°C sous le PSM. Cette étape, répétée 2 à 4 fois permet d'optimiser la récupération des CTV. A ce stade, les villosités commencent à être bien digérées, la quantité de CTV diminue fortement dans les surnageants et continuer les digestions provoquerait un relargage de fibroblastes. Après ces étapes, les tubes contenant les CTV sont centrifugés. Les culots cellulaires sont repris dans un volume maximum de 2 mL de milieu sans sérum de veau fœtal (DMEM (Thermofisher Scientific™ 11880) (1X) ([+]1g/L D-Glucose [+] pyruvate [-] L-Glutamine [-] Rouge de phénol) + 1% GlutamMAX™ (100X) (Gibco® 35050-061), +1% de Pénicilline / streptomycine 15140-122 Gibco®). Cette suspension cellulaire est déposée sur un gradient de percoll que l'on a préparé en amont (annexe 4) et soumise à une centrifugation de 2500 rpm (rotations par minutes), pendant 20 minutes avec une accélération douce. Les CTV sont séparés et se retrouvent à une densité correspondant à 20 et 25 % du gradient de percoll. La bande de percoll contenant les cellules est récupérée et resuspendue dans un volume adéquat de milieu complet (DMEM (1X) ([+]1g/L D-Glucose [+] pyruvate [-] L-Glutamine [-] Rouge de phénol) + 10% Sérum de veau fœtal CVFSVF00-01 Euro bio®, + 1% GlutamMAX™ (100X) (Gibco® 35050-061), +1% de Pénicilline / streptomycine 15140-122 Gibco®). Une numération par une cellule de comptage dans du Bleu de Trypan (Cell counter Biorad®) nous permet de déterminer le nombre total de cellules isolées et leur *viabilité*. Les cellules sont ensuiteensemencées dans des boîtes de culture. Les boîtes de diamètre 35mm sont utilisées pour 1,2 millions de cellules dans 1.5 mL de milieu complet et les boîtes de diamètre 60mm sont utilisées pour 3 millions de cellules dans 3 mL de milieu complet. Les cellules sont ensuite placées dans un incubateur à 37°C, 5% de CO₂. L'ensemble des étapes de la récupération des CTV est reproduit sur le schéma de la Figure 20 pour plus de compréhension. Le lendemain, les cellules sont lavées à l'HBSS 1X cinq fois afin d'éliminer les cellules mortes ou non adhérentes puis réincubées dans du milieu de culture à 37°C, 5% de CO₂ jusqu'au traitement.

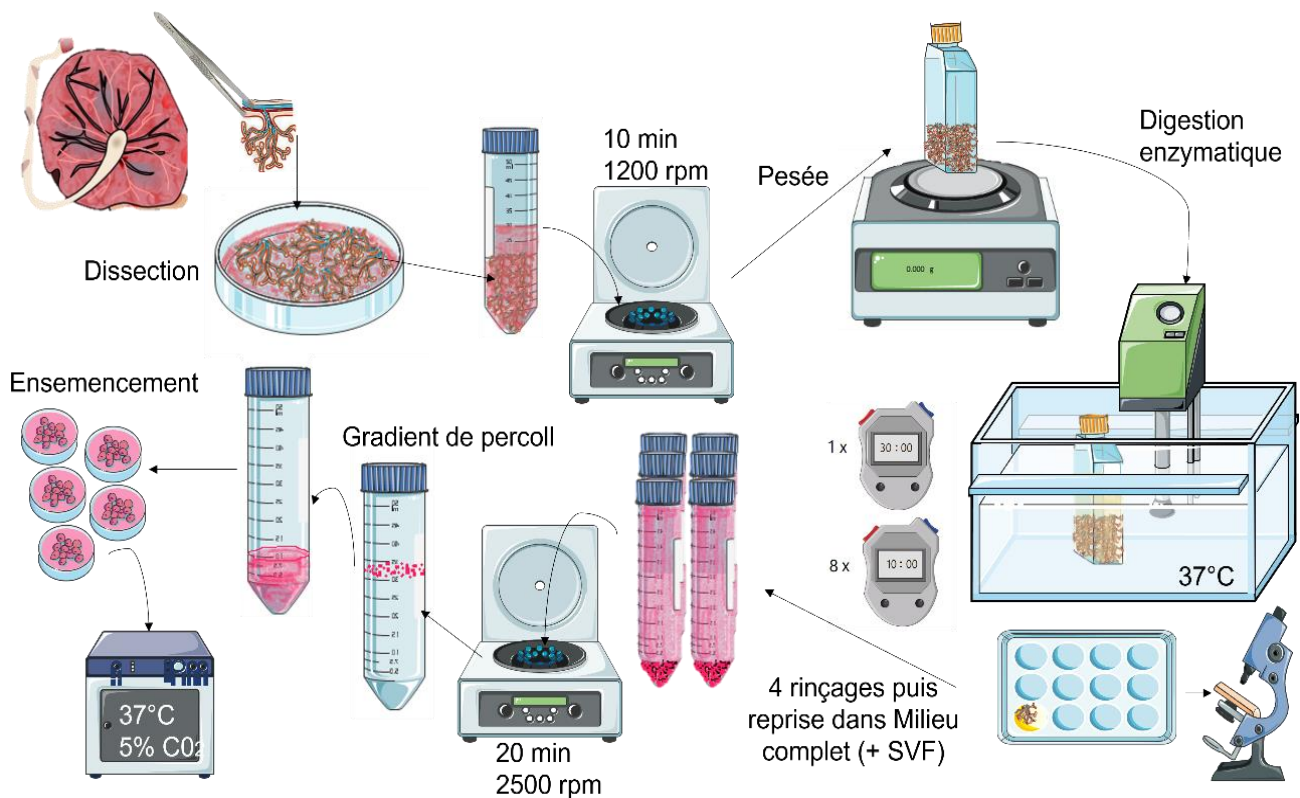


Figure 20 Représentation schématique des différentes étapes essentielles de l'isolement des CVT pour la culture cellulaire primaire.

Traitement des cellules

L'objectif est d'étudier l'effet de l'alcool sur différentes fonctions trophoblastiques (sécrétion/transport/métabolisme) mais aussi de regarder l'impact de l'alcool sur la formation du syncytium (essentiel à l'ensemble de ces fonctions). Le lendemain de la culture, après avoir laissé reposer les cellules minimum 2h dans le milieu complet post lavage, celle-ci vont être traitées selon 3 conditions différentes :

- Sans traitement « contrôle », milieu complet seul
- Traitement alcool « 0.5g/L », milieu complet + éthanol pur dilué à [0.5g/L]
- Traitement alcool « 2g/L », milieu complet + éthanol pur dilué à [2g/l]

Le milieu complet utilisé pour les traitements est le même que précédemment c'est-à-dire qu'il est composé de DMEM (1X) (Thermofisher Scientific™ 11880) + 1g/L D-Glucose + pyruvate [-] L-Glutamine [-] Rouge de phénol (Gibco™, 11880028), 10% sérum de veau foetal CVFSVF00-01 Euro bio©, 1% GlutamMAX™ (100X) (Gibco© 35050-061) et 1% de Pénicilline / streptomycine 15140-122 Gibco©. Les calculs de dilution ont pris en compte la masse volumique de l'alcool. L'éthanol utilisé est pur et la quantité prélevée à diluer

dans le milieu complet dépend de la condition. Ainsi traitées, les cellules vont être incubées dans le milieu 24h, 48h ou 72h à 37°C, 5% de CO₂ avant récupération.

Récupération des cellules après traitement

Une fois la durée du traitement effectuée, les surnageants sont récupérés, poolés par condition et centrifugés, à 1200 rpm pendant 10 minutes afin d'éliminer les débris cellulaires, puis redistribués en volume de 1mL dans des tubes à hémolyse. La totalité des surnageants est placée à -20°C en attente des dosages. Parallèlement, les cellules sont lavées 3 fois à l'HBSS 1X puis récupérées par trypsination (Trypsine 0.05% EDTA 1X-Gibco® 25300-062) et centrifugées à 1200 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est repris dans 1mL de DPBS 1X à 4°C pour bien laver les cellules et les transférer dans des eppendorfs avant d'être de nouveau centrifugés en spin (centrifugation rapide). Les culots cellulaires sont asséchés et plongés dans l'azote liquide puis conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation pour les analyses transcriptionnelles (culots 1.2millions de cellules) et protéomiques (culots de 3 millions de cellules).

Validation du modèle et contrôle de toxicité

Au cours des 96h de culture (24h de repos + 24h/48h/72h de traitement) les CTV ne se divisent pas mais se différencient. Ils vont s'agréger et fusionner pour former le syncytiotrophoblaste (ou syncytium). Cette fusion, faisant intervenir différentes voies, va permettre la sécrétion de différentes hormones dont l'hCG (human Chorionic Gonadotrophin hormone) qui sera notre témoin de validation des cultures trophoblastiques. Pour chaque temps, chaque boîte de chaque condition, un dosage de la sécrétion d'hCG sera réalisé afin de valider les cultures. De la même manière, un dosage de LDH (témoins de mort cellulaire) est réalisé afin de s'assurer de la *viabilité* cellulaire jusqu'au dernier prélèvement, à 96h de culture.

Fixation des cellules pour index de fusion

Pour chaque culture, 2 boîtes de 1.2millions de cellules par condition et par temps sont fixées avant d'observer la fusion des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblastes par immunocytochimie. Pour ce faire, une fois le temps de traitement fini et le surnageant prélevé, les cellules sont rincées au DPBS 1X et exposées immédiatement à du méthanol glacé (-20°C) pendant 8 minutes (boîtes placées à -20°C également). Une fois les 8 minutes passées, le méthanol est éliminé et les cellules sont rincées 4 fois au DPBS 1X froid (4°C).

Une fois les rinçages effectués, 1mL de DPBS 1X froid est laissé dans chaque boîte et celles-ci sont placées directement à 4°C jusqu'à utilisation pour le test d'index de fusion.

Expérimentations et analyses *in vitro*

Test d'index de fusion

Le test de fusion est un test basé sur l'évaluation de la fusion cellulaire *via* une approche d'immunocytochimie. Le but est de marquer, à l'aide d'anticorps couplés à différents fluorochromes, les membranes cellulaires et les noyaux afin de suivre l'évolution de la fusion des cytotrophoblastes villosités en syncytiotrophoblastes à la suite d'une exposition à l'alcool *in vitro* et/ou *in vivo*. La desmoplakine (DSK) est une protéine des jonctions d'ancrage qui permet la cohésion intracellulaire. Elle lie les filaments du cytosquelette aux desmosomes et permet l'adhésion des cellules adjacentes entre elles. Le marquage à la desmoplakine va permettre de révéler les membranes plasmiques. Le marquage des noyaux par le DAPI (molécule intercalante de l'ADN, fluorescente) permettra le dénombrement des noyaux cellulaires et leur répartition dans le syncytium afin de déterminer un index de fusion des trophoblastes en culture.

Protocole de marquage des cellules

A la suite de la fixation au méthanol, les cellules sont rincées au DPBS 1X à température ambiante et incubées dans une solution de saturation de sites non spécifiques (DPBS 1X + Albumine (BSA) 3%) pendant 1 heure. Un anticorps anti-desmoplakine (Abcam© 16434, souris) dilué dans une solution DPBS 1X +BSA (1%) est ajouté et laissé 2h à température ambiante. Après 2h d'incubation les boîtes sont lavées au DPBS 1X, l'anticorps secondaire Alexa fluor 488 (chèvre anti-souris) dilué dans une solution DPBS 1X +BSA (1%) est ajouté et incubé pendant 1h à l'obscurité. Les cellules sont de nouveau rincées puis le DAPI (DAPI Sigma© 20mg/mL) est ajouté pendant 10 minutes afin de marquer les noyaux. Enfin le montage des lames se fait avec un liquide de montage de type DAKO Monting medium (Sigma©, S3023). Les boîtes sont laissées à température

ambiante toute la nuit pour une polymérisation totale puis placées à 4°C jusqu'à l'acquisition des images.

Acquisition des images en microscopie à fluorescence

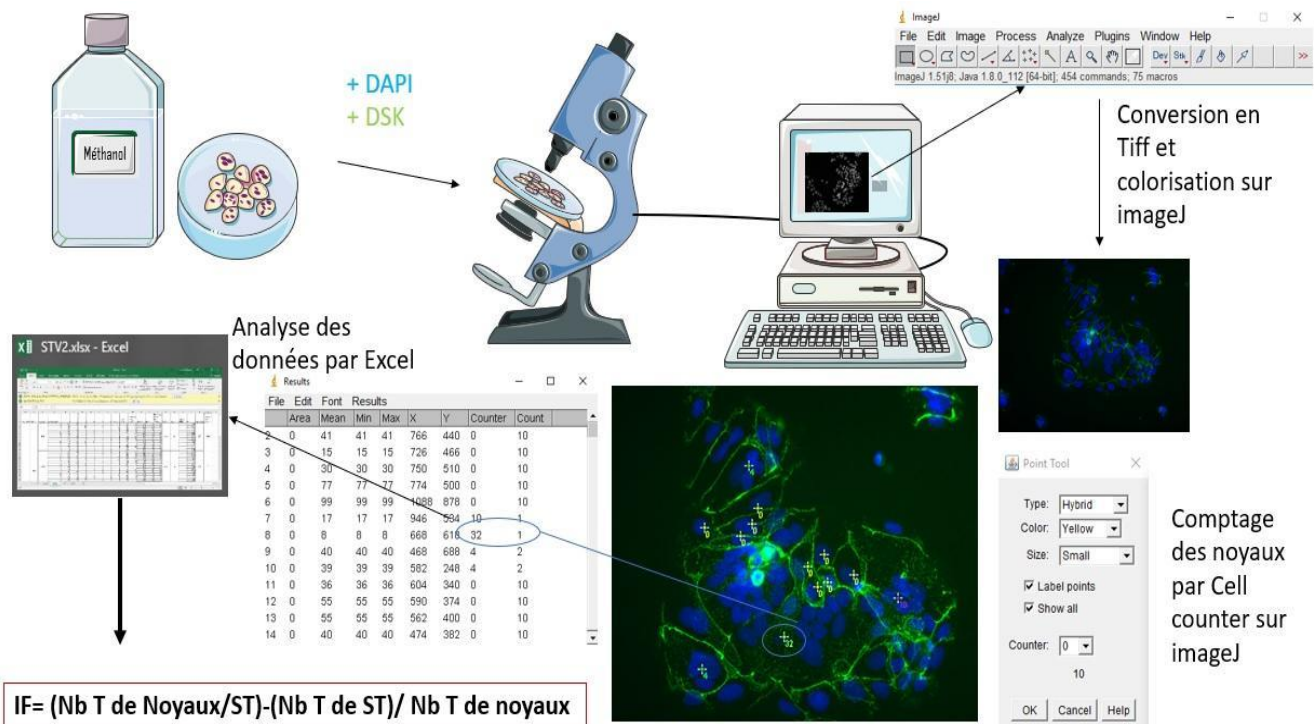


Figure 21 Représentation schématique des différentes étapes de fixations, immunomarquages, acquisitions et traitement des données de la technique d'index de fusion des cytotrophoblastes.

L'acquisition des images se fait par un microscope à fluorescence BX60 OPTIMUS. Les images sont prises par la caméra avec un objectif X40 (objectif en immersion) et traitées par le logiciel Vision® stage fluo. Six acquisitions sont faites à l'aveugle suivant un schéma en série (milieu, haut, bas, gauche, droite + une au hasard) pour chaque boîte (2 boîtes par condition) afin d'avoir un résultat représentatif (12 images par conditions au total). Le traitement des images est réalisé avec le logiciel ImageJ. Le comptage des CTV et ST pour index de fusion se fait également grâce à ce logiciel, il est possible de dénombrer la répartition des noyaux cellulaires et ainsi déterminer le nombre de cellules mononuclées (CT) et le nombre de syncytium (ST) formés (noyaux>2/cellule).

Les différents CT et ST sont recensés dans un Tableur Excel et l'index de fusion est mesuré par la formule :

$$IF = \frac{(\text{Nombre de noyaux par ST}) - (\text{nombre total de syncytium})}{\text{nombre total de noyaux de l'image}}$$

Un schéma récapitulatif du test de l'index de fusion est représenté sur la Figure 21 pour une meilleure compréhension. Les résultats sont ensuite mis en forme et analysés par le logiciel Graph Pad prism 7.

Analyses transcriptionnelles

L'analyse des transcrits permet une analyse qualitative des gènes différentiellement exprimés entre les échantillons « témoin » et les échantillons « alcool ». Ainsi il sera possible de ressortir l'effet de l'alcool sur les différentes voies de signalisation essentielles au bon développement du fœtus. Ces analyses de transcrits ont pu être effectuées sur les cellules issues de la culture primaire (culots 1.2 millions) et sur les villosités issues de la dissection du placenta et congelées après incubation dans le RNAlater® ou encore sur les villosités issues des explants villositaires et congelées après incubation dans le RNAlater®.

Extractions d'ARN sur culots cellulaires

Les extractions d'ARN à partir des culots secs (1.2 million de cellules) ont été réalisées sur colonne avec le kit d'extraction d'ARN Arcturus® Picopure®. Les culots cellulaires de cellules traitées aux différentes conditions sont d'abord repris dans du tampon de lyse. Après incubation de 30 minutes à 42°C suivie d'une heure minimum de stockage à - 80°C, de l'éthanol à 70 % est ajouté à chaque échantillon. Cette solution est ensuite déposée au centre de la colonne de purification préalablement traitée au tampon de conditionnement (comme indiqué par le fournisseur du kit). Après centrifugation permettant aux ARN de se lier à la colonne, un traitement à la Dnase Qiagen ® (ref 79254) est réalisé. La colonne est ensuite lavée et centrifugée plusieurs fois. Enfin un tampon d'élution est déposé au centre de la colonne afin de détacher les ARN qui y sont liés puis la colonne est centrifugée sur un eppendorf de 0,5mL afin de récupérer les ARN dans le tampon d'élution pour dosage des ARN.

Extractions d'ARN de villosités

Les échantillons utilisés sont les villosités ayant été incubées 24h dans une solution de RNA Later, trempées dans de l'azote liquide puis conservées à sec à -80°C. Les extractions sont réalisées sur des colonnes d'extraction du kit RNeasy Midi Kit® conformément aux instructions du fournisseur kit, Qiagen® (ref 75144).

La première étape consiste à peser la ou les villosités utilisées pour extraction (>20mg-250mg<). Pour les extractions de villosités issues directement de la dissection du placenta à l'arrivée au laboratoire, une villosité de chaque endroit (bords, centre, cordon + une au hasard) sont poolées pour avoir une bonne représentation de l'organe entier.

Une fois pesées, les villosités sont placées dans des Falcon de 15mL pour être broyées par ULTRA TURRAX® (IKA Disperseurs Fragmentation ULTRA TURRAX®). Une fois broyées, les villosités sont centrifugées pour éliminer les débris tissulaires. Le surnageant de chaque tube est prélevé et solubilisé dans de l'éthanol 70%. Puis chaque solution est déposée sur une colonne RNeasy spin® fournie par le kit. Après différentes centrifugations permettant aux ARN de se lier à la colonne, un traitement à la DNase Qiagen® (ref 79254) est réalisé. La colonne est ensuite lavée et centrifugée plusieurs fois. Enfin de l'eau RNase free est déposée au centre de la colonne afin d'éluer les ARN qui y sont liés puis la colonne est centrifugée sur un eppendorf de 0.5mL afin de récupérer les ARN dans l'eau RNase free pour dosage des ARN.

Mesure des ARN issus des différentes extractions

A l'issue de l'extraction, les ARN sont dosés avec un Nanodrop (Nanodrop® Spectrophotometer 11 ND-1000). Ce dernier, en mesurant l'absorbance des échantillons à 260 nm (longueur d'onde d'absorption des acides nucléiques), détermine la concentration d'ARN présents dans les éluats d'extraction. Le Nanodrop® permet également de déterminer la pureté des ARN extraits (contaminations protéiques (rapport des mesures A260/280) et organiques (rapport des mesures A260/A230)). Une fois ces mesures effectuées, un inhibiteur de RNases (RNaseOUT Invitrogen™) est ajouté à chaque échantillon afin d'éviter toute dégradation puis ces derniers sont conservés à -80°C.

RTqPCR sur plaques PCR Eurogentec®

Rétro transcription d'ARN en ADNc

Le but de la rétrotranscription (RT) est de transformer les ARN précédemment extraits en ADN complémentaires. Pour chaque RT, 500ng d'ARN dilués dans de l'eau RNase-DNase free (qsp 10µL) sont utilisés. On ajoute à chaque échantillon 1µL de Random Primers dilué (Random Primers [3µg/µL] 48190-011 Invitrogen™) et 1µL de dNTP (préparé à partir du kit dNTPset [100mM] 10297-018 Invitrogen™). Les ARN sont ensuite linéarisés par chauffage afin de faciliter la réaction de rétro transcription à venir. Les échantillons sont donc placés dans un thermocycleur pendant 5 minutes à 65°C.

La rétrotranscription repose sur l'action d'une ADN polymérase ARN-dépendante (Super script III Invitrogen™) capable de synthétiser de l'ADNc à partir d'un brin matrice d'ARN. Dans chaque tube d'ARN préalablement linéarisé, 6µL de MIX contenant la Super script III (kit Super script SSIII 18080-044 Invitrogen™) ainsi que 1µL de RNase out sont ajoutés. Les tubes sont ensuite placés à nouveau dans le thermocycleur où ils sont soumis à une température de 50°C pendant 50 minutes (synthèse d'ADNc par l'action de la transcriptase inverse) puis à une température de 70°C pendant 15 minutes (inactivation de la Super script III et séparation des brins d'ARN et d'ADNc). Les ADNc ainsi récupérés sont conservés à -20°C jusqu'à utilisation pour la PCR quantitative.

PCR (Polymerase chaine reaction) quantitative

L'objectif de la PCR quantitative (ou qPCR) est la quantification relative des transcrits présents dans un échantillon exposé à l'alcool *in vivo* ou *in vitro* par rapport à un échantillon témoin (ou un échantillon issu d'IVG par rapport à un terme). Pour réaliser les qPCR, nous avons utilisé le kit Takyon TmROX SYBR Master Mix dTTP Blue® (Eurogentec®, UF RSMB0701). Ce dernier utilise les propriétés d'un intercalant de l'ADN, le SYBER Green, capable d'émettre une fluorescence lorsque l'ADN est sous forme bi caténaire. Dans le thermocycleur (CFX384 Touch™ Real time PCR detection System, BIORAD™), les fragments d'ADNc spécifiques à un couple d'amorces donné sont amplifiés à chaque cycle. Du fait des propriétés du SYBER Green, la fluorescence augmente également à chaque cycle d'amplification. Le thermocycleur est capable de détecter la fluorescence émise par le SYBER Green à partir d'un certain seuil, correspondant à une quantité d'amplicons donnée. Ainsi, le nombre de cycles nécessaires pour atteindre le

seuil de détection de la fluorescence varie suivant la concentration initiale du fragment d'ADNc à amplifier.

Protocole

Une solution de MasterMIX est préparée avec les amorces correspondantes au gène à amplifier (Annexe 1 p331) et les ADNc sont dilués au 1/10e dans de l'eau RNase free. Les plaques utilisées pour la qPCR sont des plaques transparentes Eurogentec®. Dans chaque puits : 2µL d'ADNc dilué+ 8µL de MasterMIX (comprenant les amorces) sont déposés. Chaque échantillon est déposé en duplicate et des contrôles positifs et négatifs sont réalisés pour chaque couple d'amorce afin de vérifier qu'il n'y a pas de contamination dans les tubes d'amorces. La plaque est ensuite filmée puis centrifugée avant d'être déposée dans le thermocycleur pour amplification. Le programme d'amplification est constitué de 40 cycles, comprenant chacun une étape de dénaturation (10sec à 95°C) et une étape d'hybridation/élongation (90sec à 60°C). A l'issue de ce programme, un cycle de dissociation a été réalisé en soumettant les amplicons à une élévation progressive de température (10 sec à 95°C, 2sec à 60°C puis 5sec à 95°C). Ces différentes phases sont retranscrites dans la Figure ci-dessous (Figure 22).

La température de dissociation d'un fragment d'ADN double brin étant dépendante de sa

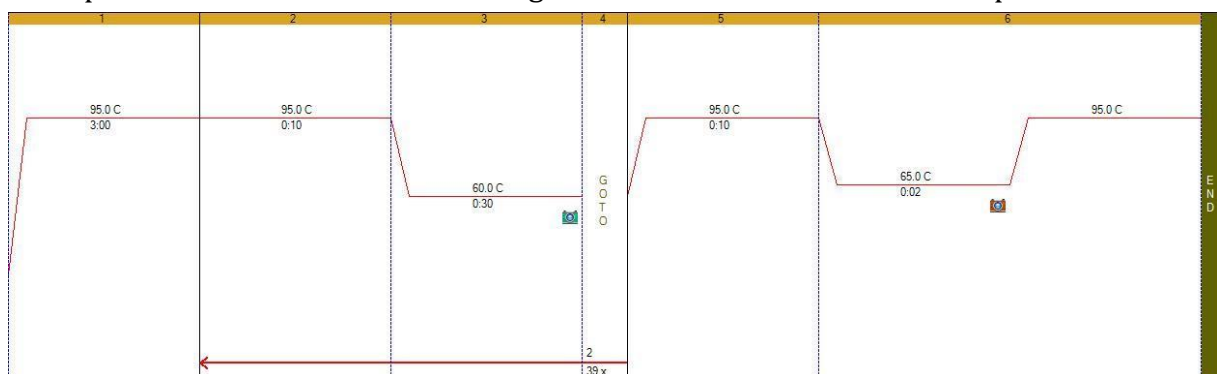


Figure 22 – Programme d'amplification réalisé par le thermocycleur Biorad™ de la qPCR.

séquence, cela permet de vérifier que l'amplification s'est bien faite sur une séquence unique. Le logiciel Bio-rad CFX Maestro (software 2. 0) nous permet d'analyser les résultats et de vérifier les courbes d'amplification (Figure 23 A), de dissociation (Figure 23 B), ainsi que le pic de dissociation (Figure 23 C). Afin de normaliser l'expression des gènes testés, nous avons utilisés 3 gènes de référence : RPLO, SDHA et RPL13 (Annexe 1).

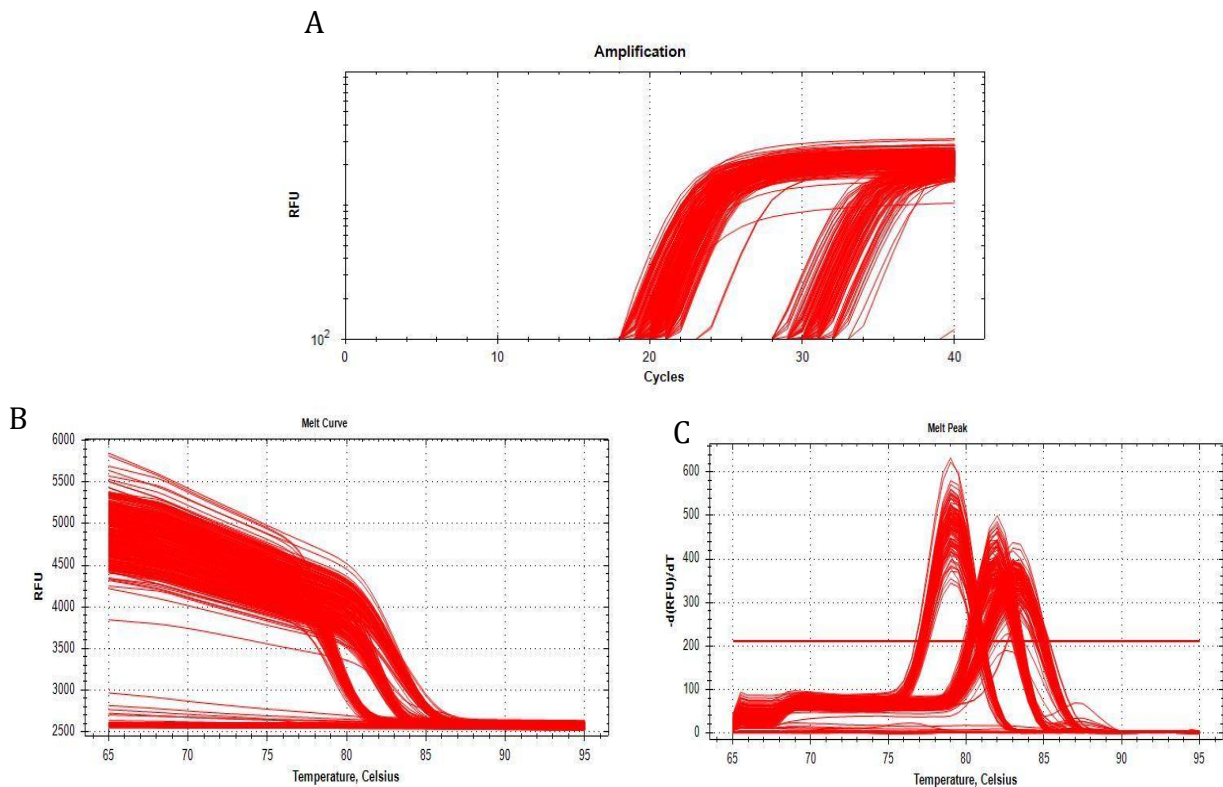


Figure 23 Courbes d'amplification (A), de dissociation (B) et pic de dissociation (C) généré par le logiciel CFX Maestro pour validation des résultats de la qPCR.

Ces gènes, dont la transcription ne varie pas suivant les conditions expérimentales testées (terme, IVG, CT, ST, contrôle, traitements), reflètent le niveau d'expression basal de la cellule et constituent un étalon. La quantification relative des transcrits est calculée selon la méthode des ΔCQ (CQ « control quality » = valeur de sortie de cycle) décrite par Pfaffl en 2001. Pour chaque échantillon on a travaillé par défaut en $\Delta\Delta CQ$ pour faire un ratio normalisé sur les gènes de référence et le témoin. Enfin le Fold change, correspondant à la valeur relative entre l'expression transcriptionnelle d'un échantillon « Test » par rapport au témoin, est calculé par la formule suivante : $FC = 2^{-\Delta\Delta CQ}$.

Les résultats des qPCR ont été analysés avec le logiciel Excel puis GraphPad® Prism® 7.0.

RTqPCR pour plaque Qiagen® RT² Profiler™ PCR Array

Une analyse transcriptionnelle a été réalisée sur plaques Qiagen® RT² Profiler™ PCR Array coatées. Le système PCR RT² Profiler permet d'analyser rapidement l'expression génique des différentes voies de signalisation cible. Ces plaques déjà coatées permettent un gain de temps et de matériel puisque les analyses sont faites en simplicate (des contrôles qualité sont faits en amont par Qiagen®), et les contrôles positifs et négatifs sont déjà présents sur chaque plaque. Un avantage majeur de ces plaques est également

de permettre de screener plus de 300 gènes sur une même plaque pour une première analyse sans avoir à commander l'ensemble des 300 couples amorces (sens et antisens).

Pour ces analyses, 3 puces, en format 384 puits, différentes ont été étudiées :

- RT² Profiler™ PCR Array Angiogenèse Humaine (ID GeneGlobe -PAHS-024Z)
- RT² Profiler™ PCR Array Récepteurs de neurotransmetteurs humains (ID GeneGlobe-PAHS-060Z)
- Custom RT² Profiler™ PCR Array (CLAH37861) : 8 échantillons/plaque et 48 puits par échantillon (43 gènes d'intérêt + 3 gènes de ménages + deux contrôle).

Transcription inversée (rétrotranscription) d'ARN en ADNc

Un kit RT² First Strand Kit™ (Qiagen® 330401) a été utilisé pour les rétrotranscriptions spécifiques des ADNc qui seront utilisés pour les plaques RT² Profiler™ PCR Array. Pour chaque échantillon, 1µg d'ARN dilués dans de l'eau RNase-DNase free + 6µL de Buffer GE (GDNA elimination buffer) sont utilisés (qsp 14µL). Les échantillons sont incubés à 37°C pendant 5 minutes pour linéarisation des ARN puis placés immédiatement dans la glace pour 1 minute. On ajoute ensuite 6µL du mix BC5 Reverse Transcriptase Mix pour un volume total de 20µL par échantillon. Les tubes sont placés dans le thermocycleur où ils sont soumis à une température de 42°C pendant 15 minutes puis à une température de 95°C pendant 5 minutes et enfin refroidis dans la glace pour au minimum 1 min. Les ADNc ainsi récupérés sont conservés à -20°C jusqu'à utilisation pour la PCR quantitative.

PCR quantitative pour plaque PCR

Pour réaliser les qPCR, nous avons utilisé le kit RT² SYBR Green qPCR Mastermix (Qiagen® 330501). Ce dernier utilise les propriétés d'un intercalant de l'ADN, le SYBER Green, déjà décrit. Dans le thermocycleur (CFX384 Touch™ Real time PCR detection System, BIORAD™), les fragments d'ADNc spécifiques à un couple d'amorces sont amplifiés à chaque cycle. Du fait des propriétés du SYBER Green, la fluorescence augmente également à chaque cycle d'amplification. Le thermocycleur est capable de détecter la fluorescence émise par le SYBER Green à partir d'un certain seuil, correspondant à une quantité d'amplicons donnée. Ainsi, le nombre de cycles nécessaires pour atteindre le seuil de détection de la fluorescence varie suivant la concentration initiale du fragment d'ADNc à amplifier.

Protocole

Les ADNc sont dilués au 1/10^e dans de l'eau RNase free. Les plaques utilisées pour la qPCR sont les plaques RT² profiler™ PCR Array. Pour chaque échantillon une solution de MasterMIX (RT² SYBR Green qPCR Mastermix (Qiagen® 330501) + ADNc dilué + qsp H₂O Rnase/Dnase free fournie par le kit (Pour 1000µL : 500µL MasterMIX + 78.46µL ADNc + 421.54µL H₂O Rnase/Dnase free). Dans chaque puits de la plaque sont déposés 10µL du Mix précédant. La plaque est ensuite filmée et centrifugée avant d'être déposée dans le thermocycleur pour amplification. Le programme d'amplification est constitué de 40 cycles, comprenant chacun une étape de dénaturation (15 sec à 95°C) et une étape d'hybridation/élongation (1 min à 60°C). A l'issue de ce programme, un cycle de dissociation a été réalisé en soumettant les amplicons à une élévation progressive de température (10 sec à 95°C, 2 sec à 60°C puis 5 sec à 95°C).

Comme pour les plaques non coatées, la température de dissociation d'un fragment d'ADN double brin étant dépendante de sa séquence, cela permet de vérifier que l'amplification s'est bien faite sur une séquence unique. Le logiciel Bio-rad CFX Maestro (software 2.0) nous permet d'analyser les résultats et de vérifier les courbes d'amplification, de dissociation, ainsi que le pic de dissociation.

Afin de normaliser l'expression des gènes testés, nous avons utilisés les 3 mêmes gènes de référence : RPLO, SDHA et RPL13. La quantification relative des transcrits est calculée selon la même méthode des ΔCQ (CQ « control quality » = valeur de sortie de cycle). Pour chaque échantillon on a travaillé par défaut en $\Delta\Delta CQ$ pour faire un ratio normalisé sur les gènes de référence et le témoin. Enfin le Fold change, correspondant à la valeur relative entre l'expression transcriptionnelle d'un échantillon « Test » par rapport au témoin, est calculé par la formule suivante : $FC = 2^{-\Delta\Delta CQ}$.

Les résultats des qPCR ont été analysés avec le logiciel Excel puis Graph Pad prism 7.

Analyses Protéomiques

Extraction de protéines

L'extraction des protéines à partir des culots cellulaires 3 millions a été réalisée avec le tampon M-PER® (Mammalian-Protein Extraction Reagent- Thermo scientific 78501). A chaque échantillon a été ajouté 80µL de solution : M-PER + 1/100^e de Protéases (Calbiochem® 539131) +1/50^e de phosphatases (Calbiochem®524629). La solution est déposée directement sur échantillons glacés (-20°C) et chaque échantillon est ensuite passé au sonicateur® une minute puis 30 secondes. Une fois l'échantillon broyé, il a été centrifugé 12 minutes à 4°C à 13000 rpm. Les protéines se trouvent dans le surnageant et sont conservées à -80°C jusqu'à utilisation.

L'extraction des protéines des villosités a été réalisée avec le tampon T-PER® (Tissue-Protein Extraction Reagent- Thermo scientific 78510). Pour un échantillon de 300mg de villosités on a ajouté 200µL de solution : T-PER + 1/100^e de Protéases (Calbiochem® 539131) +1/50^e de phosphatases (Calbiochem®524629). La solution est déposée directement sur échantillons glacés (-20°C) et chaque échantillon est ensuite passé à l'ULTRA TURRAX® ((IKA Disperseurs Fragmentation ULTRA TURRAX®) 1minute puis 30 secondes. Une fois l'échantillon broyé, il a été centrifugé 12 minutes à 4°C à 13000 rpm. Les protéines se trouvent dans le surnageant et sont conservées à -80°C jusqu'à utilisation.

Dosage de protéines

Les protéines ont été dosées grâce à un kit de dosage protéique Pierce [™] BCA (ThermoFisher scientific® 23227). La gamme étalon a été préparée à partir des solutions du kit (diluée dans du DPBS 1X) et selon la proportion conseillée par le fournisseur allant de [0] à [200µg/mL]. 50µL de réactif (25xA+24xB+1xC) ont été déposés dans tous les puits de la plaque. Les échantillons ont été dilués au 1/50^e et 50µL ont été déposés dans les puits correspondants. Chaque dosage a été fait en triplicate pour une meilleure validation. La plaque a ensuite été incubée 1h à 60°C. La lecture des absorbances de la plaque a été faite à 650nm par l'ENSPIRE® (spectrophotomètre- lecture de microplaques- Perkin Elmer[™])

Protéome

L'analyse du protéome a été effectuée sur des villosités issues de dissection de placenta « témoins », « alcool » et de 1^{er} trimestre (précoce et tardif) lavées dans du DPBS 1X et congelées directement à -80°C *via* un bain d'azote liquide. Cette analyse a fait l'objet d'une prestation extérieure sur la plateforme Protéom'IC de l'Institut Cochin. Pour l'analyse, n=5 échantillons/condition « Témoins » - « Alcool » - « 1^{er} Trimestre Précoce » - « 1^{er} Trimestre Tardif » ont été utilisés. D'après les techniciens de la plateforme, seuls 3 échantillons pouvaient suffire pour l'analyse mais à ce stade, nous avons préféré utiliser tous les échantillons "Alcool" disponibles au moment de cette analyse et nous aligner sur ce nombre pour l'ensemble des conditions. Pour chaque placenta, 40mg de villosités ont été analysés. Directement sur la plateforme technique, les échantillons ont été broyés dans l'azote liquide puis repris dans du SDS et incubés à 95°C pour dénaturation. Les échantillons ont ensuite subi une réduction par alkylation des ponts disulfures puis ont été digérés par Trypsine à 37°C pendant toute la nuit (afin de couper les protéines en peptide de 800 à 1600kD). L'étape suivante est le fractionnement des peptides par séparation de la charge en chromatographie CSX (permet d'accrocher les peptides chargés positivement). De ce fractionnement sont ressorties 5 fractions qui ont pu être injectées sur un spectromètre de masse (TIMS-TOF™) pendant 120 min. Enfin le fichier total a été interrogé avec le logiciel MaxQuant® qui permet d'identifier des protéines par « matching » entre les séquences obtenues et le fichier FASTA théorique. Les résultats de l'analyse nous ont été fournis en quantification relative en LFQ (Label Free Quantification) qui nous donne l'intensité du peptide et donc sa quantité dans l'échantillon. Ces données ont été analysées une première fois par le logiciel PERSEUS qui permet l'élimination des protéines « peu intéressantes » (comme les protéines reverses ou les protéines contaminantes). Également le logiciel nous a permis de faire une analyse en composante principale à l'aveugle afin de vérifier si des groupes d'échantillons se séparent ou se regroupent sans tag spécifique. Pour les statistiques, la p value a été fixée à 0.05.

Enfin une analyse d'enrichissement synthétique a été réalisée avec l'aide d'une ingénieure d'étude de la plateforme Protéom'IC de l'Institut Cochin sur le logiciel INGENUITY afin d'y intégrer les données et ressortir les processus majeurs dans lesquels sont impliqués les protéines significativement différentes entre les placentas « alcool » et les placentas « témoins ». Les légendes des voies de signalisation produite par le logiciel sont résumées

en Annexe 3 afin de faciliter la compréhension mais sont également en format détaillé et complet en ligne via le lien :

https://qiagen.secure.force.com/KnowledgeBase/articles/Basic_Technical_Q_A/Legend.

Analyse des sécrétions

Dosage de l'hCG

Le dosage d'hCG est effectué sur les surnageants des cultures primaires et ceux des explants villositaires. Celui-ci est réalisé sur l'automate COBAD (8000e602) sur la plateforme de l'hôpital Cochin à l'aide de la trousse hCG (03271749). La gamme de concentration utilisée est 0.1-10000mUI/mL. La limite de détection de l'automate est de 0.6mUI/mL.

Dosage de la LDH

Le dosage de LDH est effectué sur les surnageants des cultures primaires et ceux des explants villositaires. Celui-ci est réalisé sur l'automate COBAD (6000) sur la plateforme de l'hôpital Cochin à l'aide de la trousse « LDH Roche Cobas 6000 ». La gamme utilisée est 10-1000 U/L. La limite de détection de l'automate est 8UI/mL.

Dosage de la Progestérone

Le dosage de LDH est effectué sur les surnageants des cultures primaires et ceux des explants villositaires. Celui-ci est réalisé sur l'automate COBAD (6000) sur la plateforme de l'hôpital Cochin à l'aide de la trousse « Liaison Progestérone II Gen », La gamme utilisée est 0,54-190 pmol/L. La limite de détection de l'automate est 0.4 mmol/L. Les échantillons ont le plus souvent été dilué au 1/10^e

Dosage du PLGF

Le dosage du PLGF a été effectué sur les surnageants des cultures primaires et ceux des explants villositaires. Il a été réalisé à l'aide d'un Kit de dosage Human PLGF (Quantikine® ELISA - R&D Systems® DPG00). Les tampons/réactifs ont été reconstitués et utilisés en suivant les conseils du fournisseur. Un anticorps monoclonal spécifique du PLGF humain a été préendu sur la microplaque de 96 puits fournie par le kit. La première étape est

l'ajout de 100µL de diluant par puits. Puis 100µL de standard/ control ou d'échantillon sont ajoutés en duplicate dans les puits correspondants. La plaque est ensuite incubée 2h à température ambiante. Les puits sont aspirés et lavés 4x avec le tampon de lavage fourni par le kit et 200µL d'antiPIGF humain sont ajoutés à chaque puits. A nouveau la plaque est incubée 2h à température ambiante. Les puits sont à nouveau aspirés et lavés 4x. Enfin 200µL de substrat sont ajoutés à chaque puits pendant 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité. A la fin des 30 minutes, 50µL de solution d'arrêt sont ajoutés et la plaque est lue au lecteur de microplaques ENSPIRE® (spectrophotomètre- lecture de microplaques- Perkin Elmer™) à une longueur d'onde de 450nm puis à 570nm pour correction. Les résultats sont analysés par le logiciel Excel® puis Graphpad Prism®.

Secrétome

L'analyse du secrétome a été effectuée sur des surnageants issus de perfusions placentaires de patientes « Témoins » exposées à l'alcool *in vitro*. Cette analyse a fait l'objet d'une prestation extérieure sur la plateforme Protéom'IC de l'Institut Cochin. Pour l'analyse n=5 échantillons/conditions « contrôle » « [2g/L] ». Le volume initial de chaque échantillon étant très élevé, les échantillons ont été concentrés jusqu'à 1000 fois sur colonne Amicon® 10kD (Centrifugal Filters – Protein purification and concentration-Merckmillipore™). 1/10^e des échantillons fourni a été déposé sur gel afin de vérifier les profils d'expression des différents échantillons. Un dosage sur gel a été réalisé par la plateforme puis les échantillons ont été digérés en « strap » afin d'en extraire les protéines. L'ensemble de ces digestions a été passé injectées sur un spectromètre de masse (TIMS-TOF™). Le fichier total des protéines a été interrogé avec le logiciel MaxQuant® qui permet d'identifier des protéines par « matching » entre les séquences obtenues et le fichier FASTA théorique. Les résultats de l'analyse nous ont été fournis en quantification relative en LFQ (Label Free Quantification) qui nous donne l'intensité du peptide et donc sa quantité dans l'échantillon. Ces données ont été analysées par le logiciel PERSEUS qui permet l'élimination des protéines « peu intéressantes » (comme les protéines reverses ou les protéines contaminantes). Également le logiciel nous a permis de faire une analyse en composante principale à l'aveugle afin de vérifier si des groupes d'échantillons se séparent ou se regroupent sans tag spécifique. Pour les statistiques, la p value a été fixée à 0.05 sans FDR et 0.01 avec FDR.

Imagerie

Immunohistochimie

L'immunohistochimie a été réalisée sur les villosités conservées en PFA1% issues de la dissection (lavées au DPBS 1X) ou des explants villositaires. Les villosités ont été incluses en agarose puis découpées au vibratome Leica® (VR1200S) en coupe de 100µm. Les coupes ont été perméabilisées au triton 0.5% puis saturée 4h dans la solution de saturation (BSA3%+ Triton 0.1%+ Serum Donkey 5%+ 12.5µg/mL d'IGG humain + qsp DPBS1X). Pour chaque villosités 5 couples de marquages ont été regardés :

- CD146 R (Rabbit Anti CD146 Polyclonal orb536618 – Biobyrt®) + CK7 (Anti CK7 Mouse monoclonal- M7018- Dako®)
- CK7 (Anti CK7 C terminal Rabbit - SAB450-1652- Sigma®) + CD31 (Anti CD31 Mouse monoclonal - M0823- Dako®)
- CD146 R (Rabbit Anti CD146 Polyclonal orb536618 - Biobyrt®) + CD31 ((Anti CD31 Mouse monoclonal - M0823- Dako®)
- CK7 (Anti CK7 C terminal Rabbit - SAB450-1652- Sigma®) + CD146(Mouse Anti MCAM polyclonal- SAB1406108-Sigma®)
- IgG Rabbit + CK7 (Anti CK7 Mouse monoclonal- M7018- Dako®)
- CK7 (Anti CK7 C terminal Rabbit - SAB450-1652- Sigma®) + IgG Mouse
- + 1 coupe incubée en Phalloïdine au 1/400^e

Les marquages à la CK7 ou à la phalloïdine nous ont donné une indication sur les structures membranaires de la villosité et le marquage de CD31 nous indique les structures endothéliales de la villosité. Le marquage d'intérêt est celui du CD146 qui est un des biomarqueurs de l'alcoolisation *in utero* sur le modèle murin.

Les anticorps ont été dilués dans une solution de BSA1% pour une concentration finale de [5 à 10µg] et ajoutés sur les coupes toute la nuit en agitation à 4°C. Le lendemain les coupes ont été lavées puis incubées 2h avec un couple d'anticorps secondaire :

- AF555 Donkey Anti-Rabbit + AF488 Donkey anti-Mouse (dilués au 1/500^e dans de la BSA1%)

Les coupes ont ensuite été incubées 10minutes dans une solution de DAPI au 1/10000^e. Enfin le montage des lames se fait avec un liquide de montage de type DAKO Monting

medium (Sigma©, S3023). Les boîtes sont laissées à température ambiante toute la nuit pour une polymérisation totale puis placées à 4°C jusqu'à l'acquisition des images.

Acquisition des images en microscopie Confocale à fluorescence

Les images ont été acquises sur l'appareil de microscopie confocale (Leica® SP8). Les images sont prises par la caméra fluo à un objectif X40 (objectif en immersion). Les longueurs d'ondes utilisées pour les acquisitions sont les suivantes (Figure 24) : 405nm pour le DAPI / 488nm pour les anticorps anti-Mouse (qui ont tous été couplé à l'anticorps secondaire AF488) / 552nm pour les anticorps anti-Rabbit (qui ont tous été couplé à l'anticorps secondaire AF555) / 638nm pour la Phalloïdine.

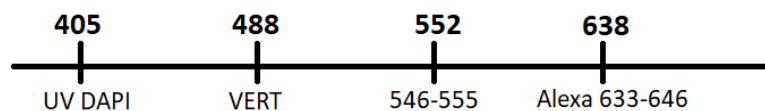


Figure 24 Représentation schématique des longueurs d'ondes utilisées pour nos analyses sur le microscope Leica SP8.

Six images ont été prises pour chaque condition et chaque coupe. Les images ont ensuite été traitées par le logiciel Fiji®.

Statistiques

Les statistiques ont été réalisées pour l'ensemble des données provenant des manipulations réalisées au laboratoire avec le logiciel GraphPad® Prism® 7.0. Le test statistique utilisé est précisé dans les légendes des Figures et le seuil de significativité est fixé à $p < 0.05$.

Pour les résultats de la plateforme Protéom'IC les statistiques ont été réalisées avec le logiciel de la plateforme et le seuil de significativité est fixé à $p < 0.01$.

Résultats

Note à l'attention du lecteur : Les figures de la partie résultats de ce manuscrit sont toutes dans un format article scientifique en anglais.

Introduction des résultats

Les résultats décrits permettent de mettre en avant une approche de trois axes de recherches avec différents modèles d'étude placentaire et via différentes analyses.

- Tout d'abord, nous avons décrit l'impact de l'alcool sur le placenta humain en tant qu'organe fonctionnel de la grossesse (partie 1). Cela nous amène à mettre en évidence un syndrome d'alcoolisme placentaire.
- Dans un second temps, nous avons développé les mécanismes par lesquels l'alcool, via le placenta, pourrait impacter le développement du fœtus et quel pourrait être le rôle du placenta dans les désordres corticaux observés chez les fœtus FASD (partie 2).
- Enfin, dans une quête de biomarqueurs placentaires d'alcoolisation prénatale, nous recherchés différentes pistes, en collaboration avec le Dr Camille Sautreuil et l'équipe du Dr Bruno Gonzalez (porteur du projet AlcoBrain) (partie 3).

Partie 1

**Le Syndrome d'Alcoolisme
Placentaire**

La première partie de cette étude a consisté à observer et décrire principalement les effets de l'alcool *in vivo* sur les fonctions placentaires essentielles au bon développement du fœtus. Avant d'étudier à proprement parler chaque fonction quelques contrôles de nos modèles *in vitro* et *ex vivo* ont été effectués. Une fois tous les modèles validés, nous avons pu analyser les trois fonctions essentielles au bon fonctionnement du placenta et au bon développement du fœtus : la fonction endocrine, le transport et le métabolisme. Cette première partie suit le plan ci-dessous :

- I. Contrôles et validation des échantillons placentaires et des modèles utilisés *in vitro* et *ex vivo*
- II. Impact de l'alcool sur la fonction endocrinienne placentaire
- III. Impact de l'alcool sur les mécanismes d'échanges et transports placentaires
- IV. Impact de l'alcool sur le métabolisme placentaire

Ces observations nous ont permis de décrire le Syndrome d'Alcoolisme Placentaire (SAP).

I. Contrôles et validation des échantillons placentaires et des modèles utilisés *in vitro* et *ex vivo*

A. Toxicologie de l'alcool *in vitro* sur culture primaire et explants villositaires : Dosage de la LDH

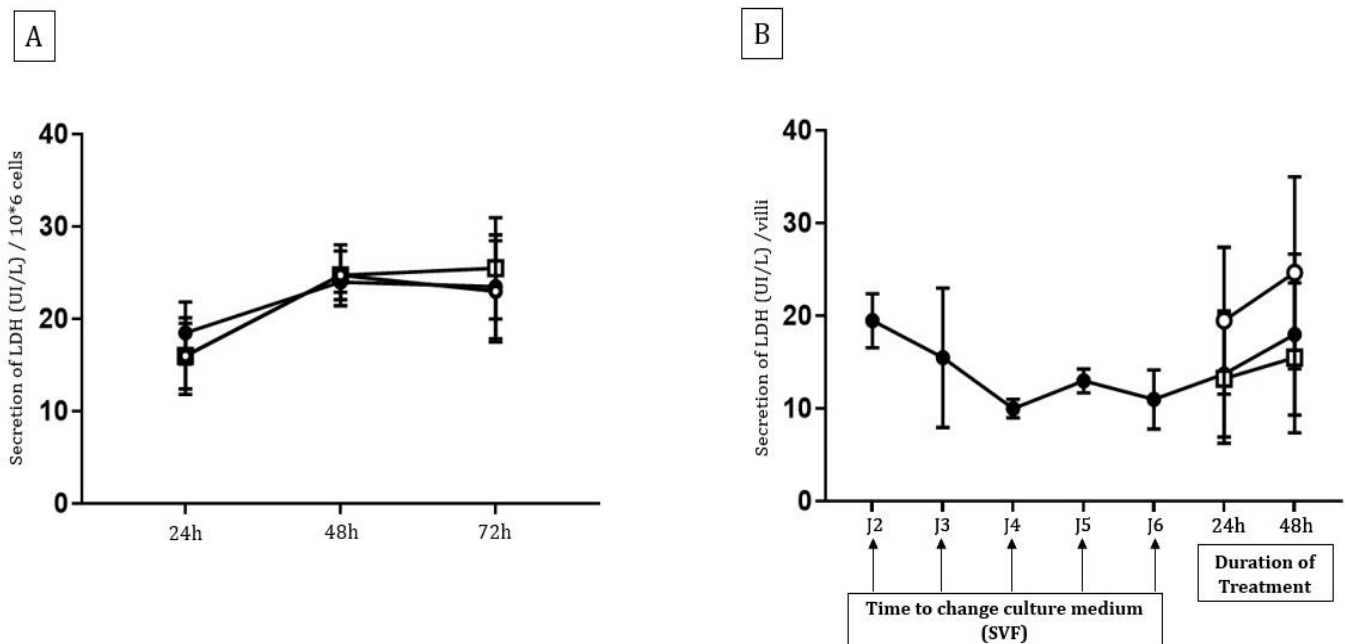


Figure 25 Effect of alcohol *in vitro* on Lactate dehydrogenase (LDH) secretion. Placentas control n=5; (A) Graphical representation of secretion of LDH (UI/L)/10⁶ cells by VCT's primary culture for 24h-48h or 72h of incubation with SVF medium (●) or ethanol treatment [0.5g/L] (◻), [2g/L] (◆) (supplemented in SVF medium). Culture medium of each condition were collected every day and LDH was measured by automate on the Cochin Hospital platform. (B) Graphical representation of secretion of LDH (UI/L) by villi incubated with SVF medium. The six first day, medium was collected and change every day. At the 6th day, for the syncytium renewal, villi were incubated with SVF medium or treatment [0.5g/L], [2g/L] of ethanol, for 24h or 48h. Culture medium were collected and LDH was measured by automate on the Cochin Hospital platform. Statistical test: ANOVA two way + Sidak's multiple comparisons test and Dunnett's multiple comparisons test were made with Graph Pad® prism 7.0 software; P-value > 0.05.

La LDH (Lactate déshydrogénase), enzyme cytoplasmique commune à toutes les cellules de l'organisme, catalyse la transformation réversible du pyruvate en lactate. Lorsque la membrane plasmique d'une cellule présente une lésion (dans le cas d'une toxicité par exemple), la LDH va être libérée (Kumar et al. 2018) dans le milieu extracellulaire. Elle est ainsi facilement dosable dans le sang ou, dans notre cas, dans le surnageant des cultures primaires ou des explants villositaires. Sa concentration extracellulaire est directement proportionnelle au pourcentage de mort cellulaire et nous permet de valider la viabilité des trophoblastes en culture. Cette mesure nous permet ainsi de vérifier la toxicité des concentrations d'alcool choisies pour les expositions *in vitro*.

Pour les cultures primaires de trophoblastes, l'exposition à l'alcool *in vitro* n'a pas d'effet sur la *viabilité* cellulaire, quelle que soit la dose et le temps d'exposition (Figure 25 (A)). Les explants villositaires (Figure 25 (B)) ont été incubés pendant six jours dans du milieu de culture contrôle afin de renouveler le syncytium. Une fois le syncytium renouvelé, les explants ont été exposés à partir de J6 pendant 24h ou 48h à un milieu supplémenté en [0.5g/l] ou [2g/L] d'alcool en comparaison à du milieu complet contrôle. L'exposition à l'alcool *in vitro* pendant 48h n'a pas d'effet significatif sur la *viabilité* de ces villosités « renouvelées ».

B. Viabilité cellulaire des cultures de trophoblastes et explants villositaire exposés ou non à l'alcool *in vitro* : Dosage de l'hCG

L'hormone glycosylée hCG, est sécrétée naturellement par les cellules trophoblastiques en culture et les explants villositaires. Sa sécrétion dans le surnageant est suivie dans le temps et son augmentation est témoin de la fonctionnalité trophoblastique *in vitro*.

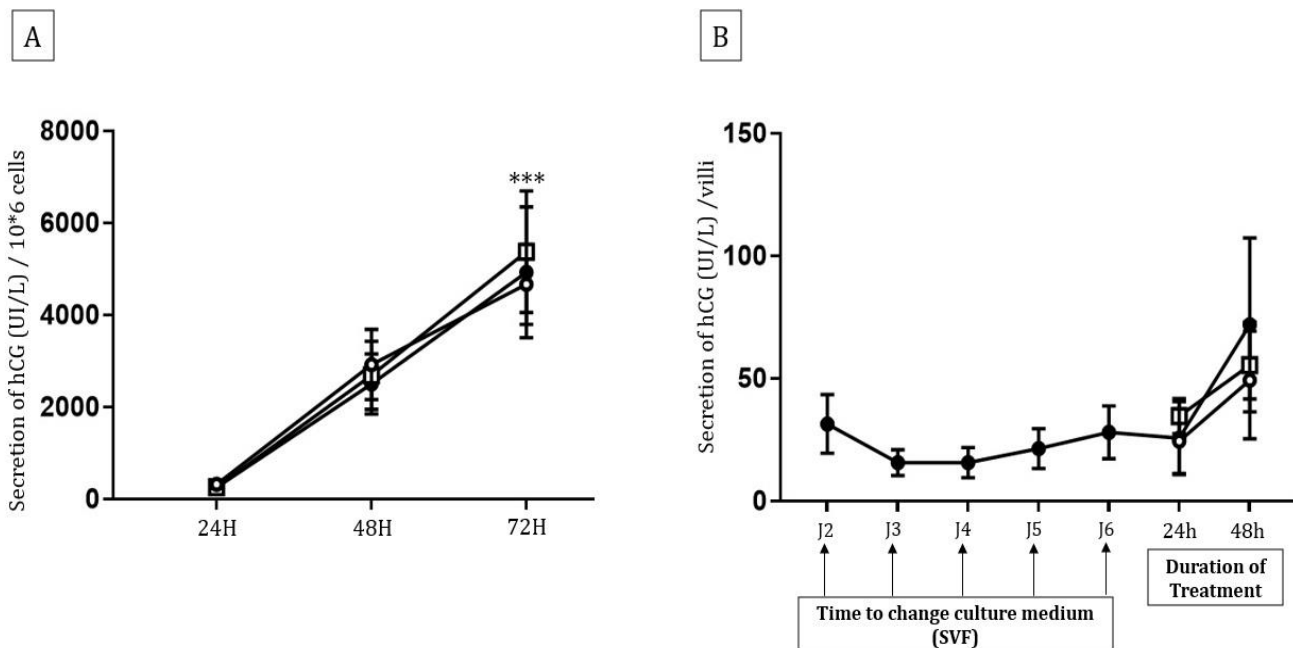


Figure 26 Effect of alcohol *in vitro* on secretion of hCG (human Chorionic gonadotrophin) *in vitro*. Villi and cells were incubated with SVF medium (—●—) or ethanol treatment [0.5g/L] (—□—), [2g/L] (—◆—); (A) Graphical representation of secretion of hCG (UI/L)/10⁶cells by VCT's primary culture for 24h-48h or 72h of incubation with SVF medium or ethanol treatment [0.5g/L], [2g/L]. Culture medium of each condition were collected and hCG concentration was measured by automate on the Cochin Hospital platform. (B) Graphical representation of secretion of hCG (UI/L) by villi incubated with SVF medium. The six first day, medium was collected and change every day. At the 6th day, for the syncytium renewal, villi were incubated with SVF medium or ethanol treatment [0.5g/L], [2g/L] for 24h or 48h. Culture medium were collected and hCG was measured by automate on the Cochin Hospital platform. Statistical test: ANOVA two way + Tukey's multiple comparisons test were made with Graph Pad® prism 7.0 software; P-value > 0.05; P-value ≤ 0.05 (*); P-value ≤ 0.01 (**); P-value ≤ 0.001 (***); P-value ≤ 0.0001 (****). Statistical result: A) control 24hvs72h= ***, [0.5g/L] 24hvs72h= ***, [2g/L]= 24hvs72h=** B) There is no significant result with ANOVA two way because of big SD.

La concentration d'hCG a été mesurée dans le surnageant des cultures primaires de CTV (Figure 26 (A)) exposées ou non à l'alcool *in vitro*. La sécrétion d'hCG des CTV en culture augmente de manière satisfaisante et cette augmentation est très significative entre 24h et 72h de culture (p-value ≤ 0.001). Cela nous permet de valider les cultures pour les différentes analyses. L'exposition à l'alcool *in vitro* n'a pas d'effet sur la sécrétion d'hCG par les CTV.

La concentration d'hCG a été mesurée dans le surnageant des explants villositaires (Figure 26 (B)). La concentration d'hCG à J2 correspond au relargage des hormones issues du renouvellement cellulaire (Concentration de LDH de la Figure 25 (B)). Une chute du taux d'hCG est observée, suivie d'une augmentation progressive à partir de J5, témoin du renouvellement du syncytium. Cette observation nous a permis de valider de façon définitive le moment du traitement des explants par l'alcool *in vitro*. L'exposition à alcool *in vitro* n'a pas d'effet sur la sécrétion d'hCG par les villosités entières.

C. Validation de la fonctionnalité endocrine des des CTVs en culture et explants villositaires, et impact de l'alcool *in vitro* sur la sécrétion de progestérone par ces deux modèles

L'hormone stéroïde Progestérone, est sécrétée naturellement par les cellules trophoblastiques en culture et les explants villositaires. Sa sécrétion dans le surnageant est suivie dans le temps et son augmentation est témoin de la fonctionnalité trophoblastique endocrinienne *in vitro*.

La concentration de PG a été mesurée dans le surnageant des cultures primaires de CTV (Figure 27(A)) exposées ou non à l'alcool *in vitro*. La sécrétion de PG des CTV en culture augmente de manière satisfaisante. Cela nous permet de valider le modèle pour les différentes analyses de la fonction endocrine. L'exposition à l'alcool *in vitro* n'a pas d'effet sur la sécrétion de PG par les CTV.

La concentration de PG a été mesurée dans le surnageant des explants villositaires (Figure 27 (B)). L'exposition à alcool *in vitro* n'a pas d'effet significatif sur la sécrétion de PG par les villosités entières.

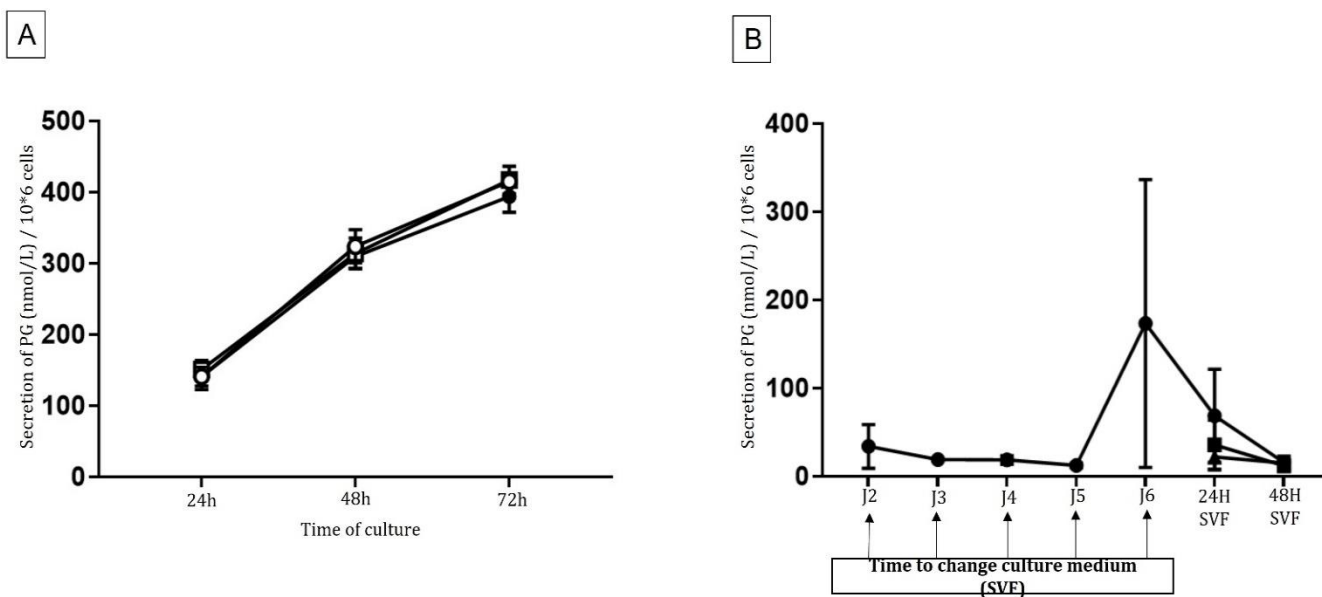


Figure 27- Effect of alcohol in vitro Progesterone (PG) secretion. Placentas control n=5; (A) Graphical representation of secretion of PG (UI/L)/10⁶cells by VCT's primary culture for 24h-48h or 72h of incubation with SVF medium (●) or ethanol treatment [0.5g/L] (□), [2g/L] (○) (supplemented in SVF medium). Culture medium of each condition were collected every day and PG was measured by automate on the Cochin Hospital platform. (B) Graphical representation of secretion of PG (UI/L) by villi incubated with SVF medium. The six first day, medium was collected and change every day. At the 6th day, for the syncytium renewal, villi were incubated with SVF medium or treatment [0.5g/L], [2g/L] of ethanol, for 24h or 48h. Culture medium were collected, and PG was measured by automate on the Cochin Hospital platform. Statistical test: ANOVA two way + Sidak's multiple comparisons test and Dunnett's multiple comparisons test were made with Graph Pad® prism 7.0 software; P-value > 0.05.

D. Impact de l'acétaldéhyde *in vitro* sur la sécrétion d'hCG et de Progestérone (PG) des CTV en culture

Il a été décrit dans l'introduction de ce manuscrit que l'éthanol ingéré est métabolisé en partie par le corps humain et que les effets toxiques de l'alcool sont dus en grande partie à cette métabolisation. L'alcool n'ayant pas d'effets directs significatifs sur les différents modèles *in vitro*, la question des effets de l'acétaldéhyde a été explorée. Afin de retirer un biais d'analyses, pour n=3 placentas, les cellules primaires en cultures ont été exposées, pendant 24h, 48h à 72h à différentes concentrations d'acétaldéhyde en comparaison avec le contrôle SVF. Les doses utilisées ont été choisies à partir des concentrations retrouvées dans les analyses de sang de patients ayant consommé de l'alcool [5µM], et deux doses plus élevées : forte [10µM] et très forte [50µM]. Les surnageants de cultures ont été récupérés pour doser l'hCG (Figure 28 (A)), la progestérone (Figure 28 (B)) et la LDH (Figure 28 (C)).

La LDH ayant des valeurs stables dans le temps et l'hCG augmentant de façon très significative au cours du temps (pour toutes les conditions), les cultures sont validées et

l'acétaldéhyde à [5 μ M], [10 μ M] et [50 μ M] n'impacte pas la viabilité cellulaire des CTV et ST en culture. L'acétaldéhyde n'a pas d'effet significatif *in vitro*, ni sur la sécrétion d'hCG, ni sur la sécrétion de PG quelle que soit la dose et le temps d'exposition des cellules.

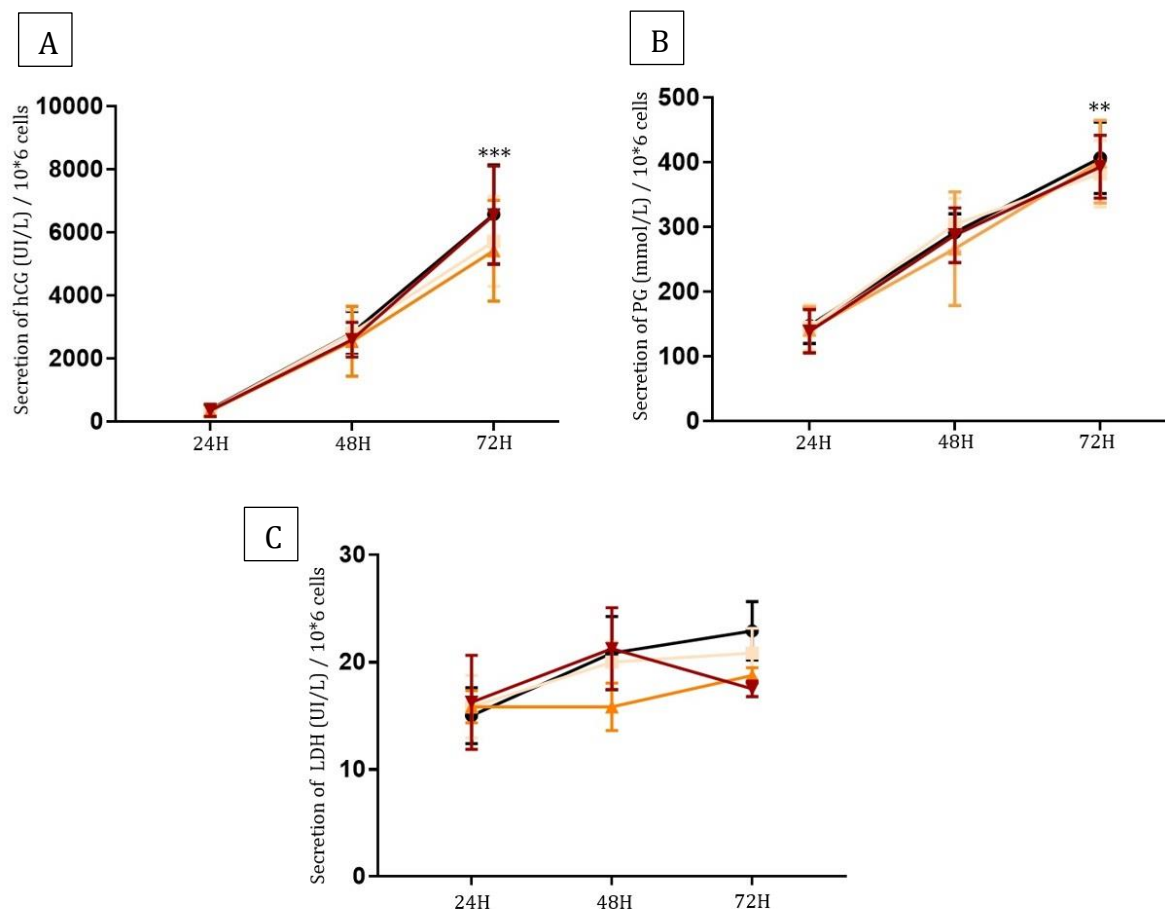


Figure 28 Effect of Acetaldehyde *in vitro* on secretion's function of VCT's cells. (A) Graphical representation of secretion of hCG (UI/L)/10⁶cells by VCT's primary culture for 24h-48h or 72h of incubation with treatment or SVF medium. Culture medium of each condition were collected and hCG was measured by automate on the Cochin Hospital platform. ● : control (SVF medium); ■ : Acetaldehyde [5 μ M]; ▲ : Acetaldehyde [10 μ M]; ▲ : Acetaldehyde [50 μ M]. (B) Graphical representation of secretion of PG (nmol/L)/10⁶cells by VCT's primary culture for 24h-48h or 72h of incubation with treatment or SVF medium. Culture medium of each condition were collected and hCG was measured by automate on the Cochin Hospital platform. ● : control (SVF medium); ■ : Acetaldehyde [5 μ M]; ▲ : Acetaldehyde [10 μ M]; ▲ : Acetaldehyde [50 μ M]. (C) Graphical representation of secretion of LDH (UI/L)/10⁶cells by VCT's primary culture for 24h-48h or 72h of incubation with treatment or SVF medium. Culture medium of each condition were collected and hCG was measured by automate on the Cochin Hospital platform. ● : control (SVF medium); ■ : Acetaldehyde [5 μ M]; ▲ : Acetaldehyde [10 μ M]; ▲ : Acetaldehyde [50 μ M]. Statistical test: ANOVA two way + Sidak's multiple comparisons test and Tukey's multiple comparisons test were made with Graph Pad® prism 7.0 software; P-value > 0.05; P-value \leq 0.05 (*); P-value \leq 0.01 (**); P-value \leq 0.001 (***). Statistical result: A) Control 24hvs72h= ***, 48hvs72h=*; [5 μ M] 24hvs72h= **, [10 μ M] 24hvs72h=**, [50 μ M] 24hvs72h= ***, 48hvs72h= *. B) Control 24hvs72h= **, [5 μ M] 24hvs72h= **, [10 μ M] 24hvs72h= **, [50 μ M] 24hvs72h= **.

➔ Conclusion : Les modèles d'exposition *in vitro* sont validés pour les analyses à venir.

E. Impact de l'alcool sur la validation du modèle de perfusion *ex vivo* et validation des deux groupes d'échantillons

Il a été décrit dans la partie matériel et méthodes (cf perfusion *ex vivo*) que la validité d'une perfusion est basée sur le taux de transfert foetal (TTF) de l'Antipyrine du compartiment maternel vers le compartiment foetal (contrôle de perméabilité placentaire). Les placentas utilisés pour la perfusion proviennent de patientes « contrôle ».

La perfusion est un modèle largement utilisé et notre expérience a prouvé la robustesse de ce modèle. L'impact de l'alcool a été mesuré pendant 2h de perfusion pour n=5 placentas perfusés avec une solution physiologique supplémentée en alcool (à une concentration de 2g/L) en comparaison avec n=5 placentas perfusés uniquement par la solution physiologique. La Figure 29 (A) nous montre que le TTF des placentas témoins ou perfusés à l'alcool est bien supérieur à 20% (limite fixée pour un TTF valide) ; la perfusion est validée pour les deux conditions. De manière logique nous observons une augmentation de l'antipyrine au cours du temps (accumulation du côté foetal avec la

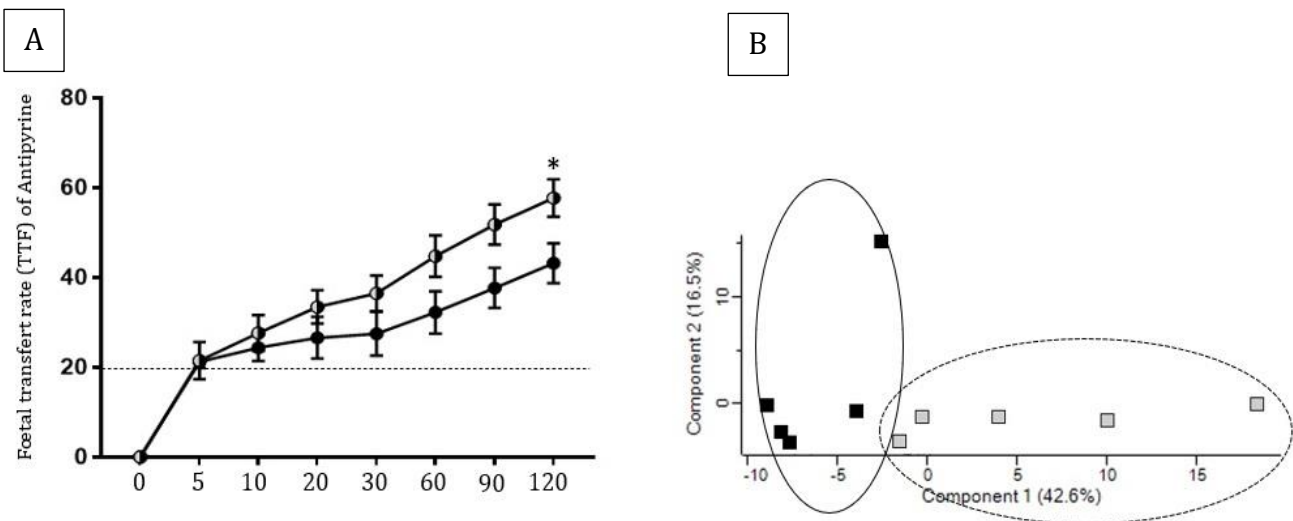


Figure 29 Validation of perfusion for secretome analysis A) Foetal transfer rate of Antipyrine (ATP); ATP is added in mother's solution and used for check the passage of perfusion across the placental barrier (from mother to foetus); Placentas were collected from control mother at term of pregnancy (vaginal delivery) and perfused with EARL's solution (physiological solution)+ATP with [2g/L]EtOH (○ : Alcohol n=5) or without alcohol (● : Control n=5). ATP concentration of maternal eluate and foetal eluate were measured by HPLC and TTF was calculated by the formula: $TTF = \frac{\text{Foetal concentration of ATP}}{\text{Maternal concentration of ATP}} \times 100$. Statistical test: multiple t-test comparisons were made with Graph Pad® prism 7.0 software; P-value >0.05; P-value ≤ 0.05 (*). B) Schematic representation of unsupervised analysis into principal components analysis (PCA) with Perseus software. The software is asked to select the samples blindly according to the percentage of proteins present in each sample. In an unsupervised way, the software tells us that when we cross the 2 main components (component 1 = 42.6% of the proteins analysed in the sample; component 2 = 16.5% of the proteins analysed in the sample) we find 2 groups of samples are distinct ■ : control n=5; □ alcohol n=5; software tells us that 2 groups represent 42.6% of the proteins analysed: ⊖ = Placenta control; ⊕ = Placenta Alcohol.

recirculation) et de manière intéressante, nous observons que l'alcool augmente significativement le TTF à 120 minutes de perfusion en comparaison avec les placentas « contrôles ».

Une fois ces perfusions validées, les éluas fœtaux ont été récupérés afin d'analyser l'impact de l'alcool *in vitro* sur le secrétome fœtal. La Figure 29 (B) représente l'analyse en composantes principales réalisée à l'aveugle par le logiciel Perseus. Cette analyse non supervisée nous permet de valider que le groupe de placentas « contrôle » est bien distinct du groupe « alcool ». Nous observons une valeur particulière/aberrante pour les placentas « contrôle » qui est à la limite du groupe « alcool ». Ces résultats nous permettent de valider les deux groupes d'échantillons pour les analyses à venir et d'affirmer que l'alcool perfusé du côté maternel impact le secrétome fœtal en seulement 2h de perfusion à une dose correspondant à un binge-drinking (2g/L).

F. Analyses non supervisées en composantes protéiques principales de villosités issues des quatre groupes d'échantillons utilisés pour l'analyse du protéome : Contrôle Terme, Alcool *in vivo*, 1^{er} trimestre précoce et 1^{er} trimestre tardif.

De la même façon que pour le secrétome, l'analyse en composantes principales, à l'aveugle, a été réalisée par le logiciel Perseus afin de valider les groupes d'échantillons analysés.

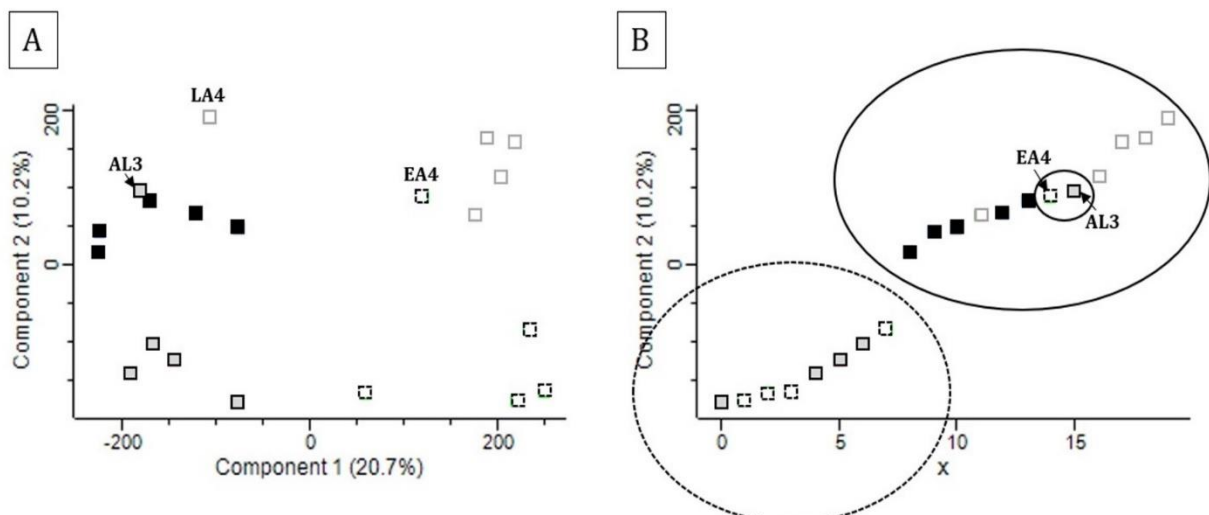


Figure 30 Schematic representation of unsupervised proteomic analysis into principal components analysis (PCA) with Perseus software. The software is asked to select the samples blindly according to the percentage of proteins present in each sample. In an unsupervised way, the software tells us that when we cross the 2 mains components (component 1 = 20.7% of the proteins analysed in the sample; component 2 = 10.2% of the proteins analysed in the sample) we find 4 groups of samples are distinct (A): ■: control n=5; □: alcohol n=5; ▒: Early Abortion n=5; ◻: Late abortion n=5; (B) Just look at the 2nd component, software tells us that 2 groups represent 10.2% of the proteins analysed: ◌ = Alcohol + Early Abortion; ◌ = control + Later Abortion.

Les analyses protéomiques ont été réalisées sur des villosités choriales de quatre groupes de n=5 placentas. Pour rappel, les placentas témoins « contrôle » proviennent de patientes à terme n'ayant pas consommé de l'alcool pendant la grossesse. Les placentas « alcool » proviennent de patientes à terme ayant consommé de l'alcool au cours de leur grossesse. Les placentas « IVG précoce » (EA) et « IVG tardive » (LA) proviennent de patientes ayant interrompu volontairement leur grossesse au 1^{er} trimestre de manière précoce ou tardive respectivement. L'utilisation de ces quatre groupes nous a permis d'obtenir l'effet de l'alcool *in vivo* sur l'expression protéique placentaire mais aussi d'obtenir une cartographie évolutive des protéines tout au long de la grossesse (1^{er} trimestre comparé au terme). La distinction des quatre groupes est validée par l'analyse en composantes principales (PCA) (Figure 30 (A)) avec trois valeurs particulières. Pour deux d'entre eux, le placenta « alcool » (AL3) et le placenta « ivg tardif » (LA4), nous observons qu'ils ont un profil protéique se rapprochant du groupe « contrôle » ; ce résultat peut s'expliquer d'un point de vue technique par l'abondance, dans ces deux prélèvements, de protéines retrouvées principalement en lien avec l'hémoglobine. Ainsi donc un mauvais lavage de la villosité avant analyses pourrait être à l'origine de cette différence notable. Quoi qu'il en soit, la PCA1(20.7%) nous permet de valider nos quatre groupes d'échantillons et d'admettre qu'ils sont significativement différents en termes de signature protéique.

De manière très intéressante, la PCA 2 (deuxième répartition en protéines la plus logique pour le logiciel (10.2%)) permet d'identifier deux groupes : le premier regroupe les placentas issus d'IVG précoces et les placentas exposés à l'Alcool *in vivo* et le deuxième regroupe les placentas contrôles avec les placentas issus d'IVG tardives (Figure 30 (B)).

- ➔ L'ensemble des expérimentations et des groupes d'échantillons étant validés, il a été possible d'analyser l'impact de l'alcool *in vivo* sur les fonctions placentaires essentielles au bon développement du fœtus
- ➔ De plus les résultats non significatifs des expérimentations d'exposition à l'alcool *in vitro*, en comparaison avec les PCA du protéome témoignent de l'importance d'analyser l'impact fonctionnel de l'alcool *in vivo* sur nos différents modèles.

II. Impact fonctionnel placentaire de l'alcool *in vivo*

Afin d'étudier l'impact fonctionnel de l'alcool *in vivo* sur le placenta, nous avons étudié trois fonctions placentaires essentielles au bon développement du fœtus en comparant des placentas « contrôle » à des placentas ayant été exposés à l'alcool *in vivo* « Alcool »)

A. La fonction endocrine (Article 1)

Comme cela a été décrit dans l'introduction, la fonction endocrine du trophoblaste est essentielle au bon fonctionnement du placenta. Majoritairement portée par le tissu trophoblastique elle est intimement liée à la fusion des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblaste.

a) Impact de l'alcool *in vivo* sur la fusion des CTV

Par immunocytochimie, nous avons déterminé l'index fusion des cytotrophoblastes isolés en culture issus de placentas de patientes ayant consommé de l'alcool au cours de leur grossesse (« alcool »), en comparaison avec des patientes « contrôle » (Figure 31 et 32).

La Figure 31 représente les index de fusion sans ajout de traitement alcool *in vitro* (les CTVs des deux groupes sont incubés avec un milieu de culture SVF sans ajout d'alcool *in vitro*). La Figure 31 (A) montre que dès les 24 premières heures de culture, la fusion des CTV de placentas issus de patientes ayant consommé de l'alcool au cours de leur grossesse est diminuée significativement par rapport à celle des CTV issus des contrôles. Cette diminution est encore plus significative à 48h et 72h d'incubation. Cette diminution de la fusion se retrouve sur les images acquises en microscopie à fluorescence (Figure 31 (B)) essentiellement à 72h, où l'on observe de plus grands ST pour les cellules de placenta contrôle en comparaison avec les cellules de placentas alcool. Ces derniers présentent quelques ST plus petits et rattachés entre eux par des CTV.

Lorsque l'on traite les deux groupes de cellules (contrôle et alcool) avec les deux doses d'alcool *in vitro* [0.5g/L] et [2g/L] pendant 24h, 48h ou 72h (Figure 32 (A) et (B)), il n'y a pas d'effet significatif de l'exposition à l'alcool *in vitro* sur les cultures de CTV issus de placentas contrôles (p-value = 0.86). Cependant, de manière intéressante, la surexposition à l'alcool *in vitro* des cellules issues de placentas ayant déjà subi une exposition à l'alcool *in vivo* accentue l'effet de l'alcool *in vivo* sur la fusion. En effet, les analyses de variances de l'ensemble des conditions montrent que la syncytialisation des

CTV des placentas exposés *in utero* à l'alcool est significativement diminuée ((p-value<0.01 **) par l'exposition *in vitro* à l'alcool, et ce peu importe la dose ingérée *in vivo* ou celle de la surexposition. Ce résultat pourrait témoigner de la mémoire cellulaire du passage de l'alcool *in vivo*. Cependant, ces analyses de variances ont également permis de démontrer que les CTV issus de placentas « alcool » surexposés à l'alcool *in vitro*, malgré la diminution significative de leur fusion par rapport aux « contrôles », ont tout de même une augmentation significative de leur fusion dans le temps (p-value< 0.0001 ****) témoignant de la vitalité des cellules.

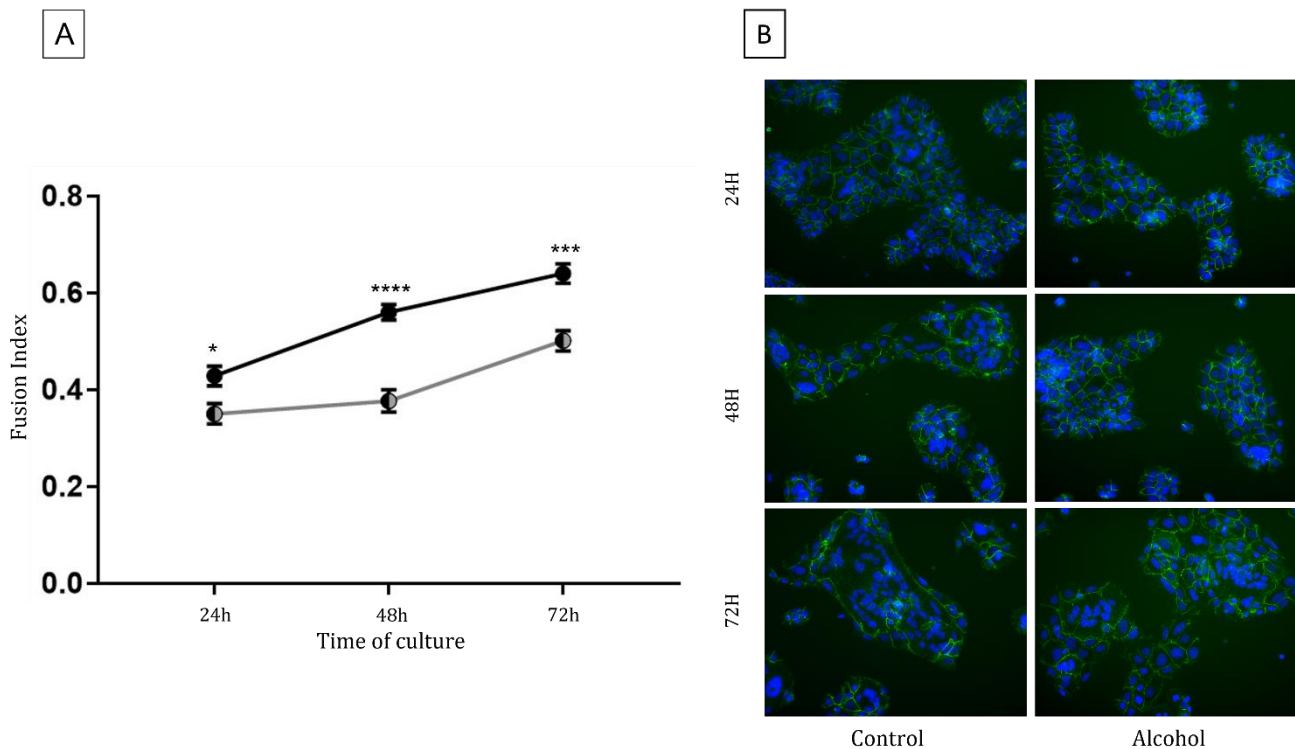


Figure 31: *In vivo* effect of alcohol on fusion Index of *in vitro* VCT's culture. Trophoblast's fusion index are measured using immunocytochemistry assay. Cells were labelled with **DAPI** [20mg/mL] and **DSK** (desmoplakine) [0.05mg/mL]. (A) Graphical representation of fusion Index in VCT's primary culture incubate for 24h-48h or 72h with SVF medium. Fls were calculated with the formula $FI = \frac{((\text{Nuclei number in ST}) - (\text{Total count of syncytium}))}{(\text{number total of nucleus in the picture})}$. CT and ST were counted manually with ImageJ software. ● : Control n=8; ● : Alcohol n=6. Statistical test: ANOVA two way + Sidak's multiple comparisons test were made with Graph Pad® prism 7.0 software; P-value > 0.05; P-value ≤ 0.05 (*); P-value ≤ 0.01 (**); P-value ≤ 0.001 (***); P-value ≤ 0.0001 (****). Statistical result: Alcohol vs control 24h= *; Alcohol vs control 48h= ****; Alcohol vs control 72h= ***. (B) Pictures of Cells fixed with methanol and labelled with DAPI (blue) and DSK (desmoplakine)(green) at 24h-48h or 72h of trophoblast cells incubated with culture medium. Pictures were taken with fluorescence microscope X40 and treated by Vision ® stage-fluo software and Imaael software

Dans l'introduction de ce manuscrit, nous avons décrit l'importance de cette fusion pour le fonctionnement optimal du placenta et notamment le rôle majoritaire du syncytium dans la production et la sécrétion d'hormones. L'impact de l'alcool sur les sécrétions des

différentes hormones placentaires a donc été investigué. Pour ces analyses, deux modèles ont été étudiés : le modèle de culture primaires de CTV et le modèle d'explants

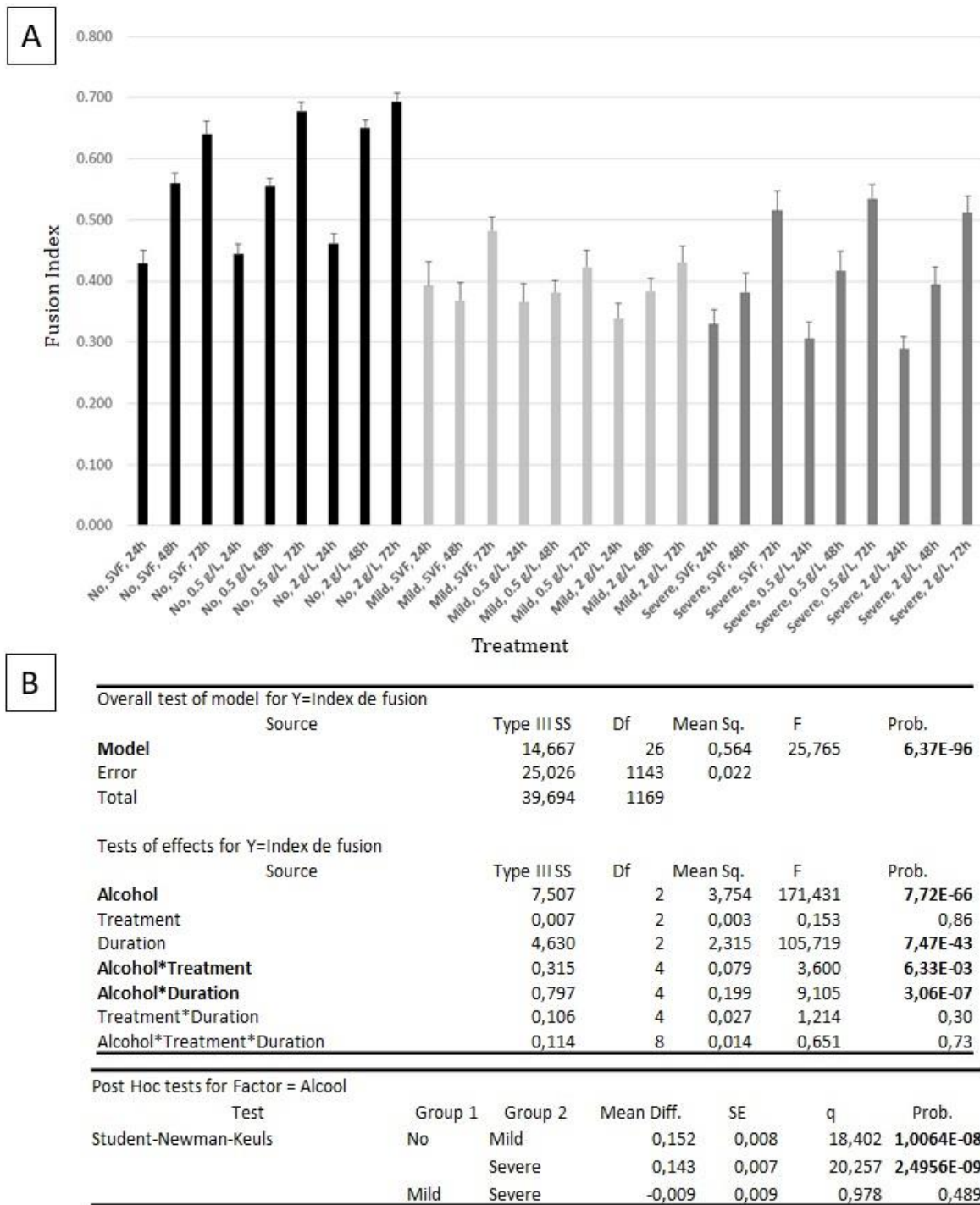


Figure 32 *In vivo* and *in vitro* effect of alcohol on fusion Index of *in vitro* VCT's culture. Trophoblast's fusion index are measured using immunocytochemistry assay. Cells were labelled with DAPI [20mg/mL] and DSK (desmoplakine) [0.05mg/mL]. (A) Pictures of Cells fixed with methanol and labelled with DAPI (blue) and DSK (desmoplakine)(green) at 24h-48h or 72h of trophoblast cells incubated with culture medium and alcohol at [0.5g/L] or [2g/L] was added. The two groups of alcohol (mild and severe) are separated for investigate the effect of chronic alcoholism. (A) Graphical representation of fusion Index in VCT's primary culture incubate for 24h-48h or 72h with culture medium and alcohol at [0.5g/L] or [2g/L]. FIs were calculated with the formula $FI = \frac{((\text{Nuclei number in ST}) - (\text{Total count of syncytium}))}{(\text{number total of nucleus in the picture})}$. CT and ST were counted manually with ImageJ software. ■: Control n=8; ■: mild Alcohol n=2 ■: severe Alcohol n=4. Statistical test: Variance analyses and post Hoc test were made by a variance analysis software. P-value > 0.05.

villositaires de placentas issus de patientes « contrôles » ou « alcool » *in vivo* non exposés à l'alcool *in vitro* (dosage d'hormones dans les surnageants).

b) Impact de l'alcool *in vivo* sur la sécrétion d'hCG

L'hormone gonadotrophine chorionique (hCG) a été dosée dans les surnageant de culture de CTVs issus de placentas à terme « contrôle » ou « alcool » (Figure 33 (A)) et dans les surnageants d'explants villositaires issus de placentas à terme « contrôle » ou « alcool » (Figure 33 (B)) incubés dans du milieu de culture contrôle « SVF ». La sécrétion d'hCG par les CTVs en culture issus de placentas exposés à l'alcool *in vivo* est très significativement augmentée par rapport à la sécrétion des cellules « contrôles » et ce, dès 48h de culture (Figure 33 (A)). De la même la manière la sécrétion de l'hCG par les explants villositaires issus de placentas « alcool » est très significativement augmentée après 48h d'incubation des explants en culture. En conclusion, l'alcool *in vivo* impacte considérablement la fonction endocrine avec la sécrétion d'hCG et ce, peu importe la dose ou le temps

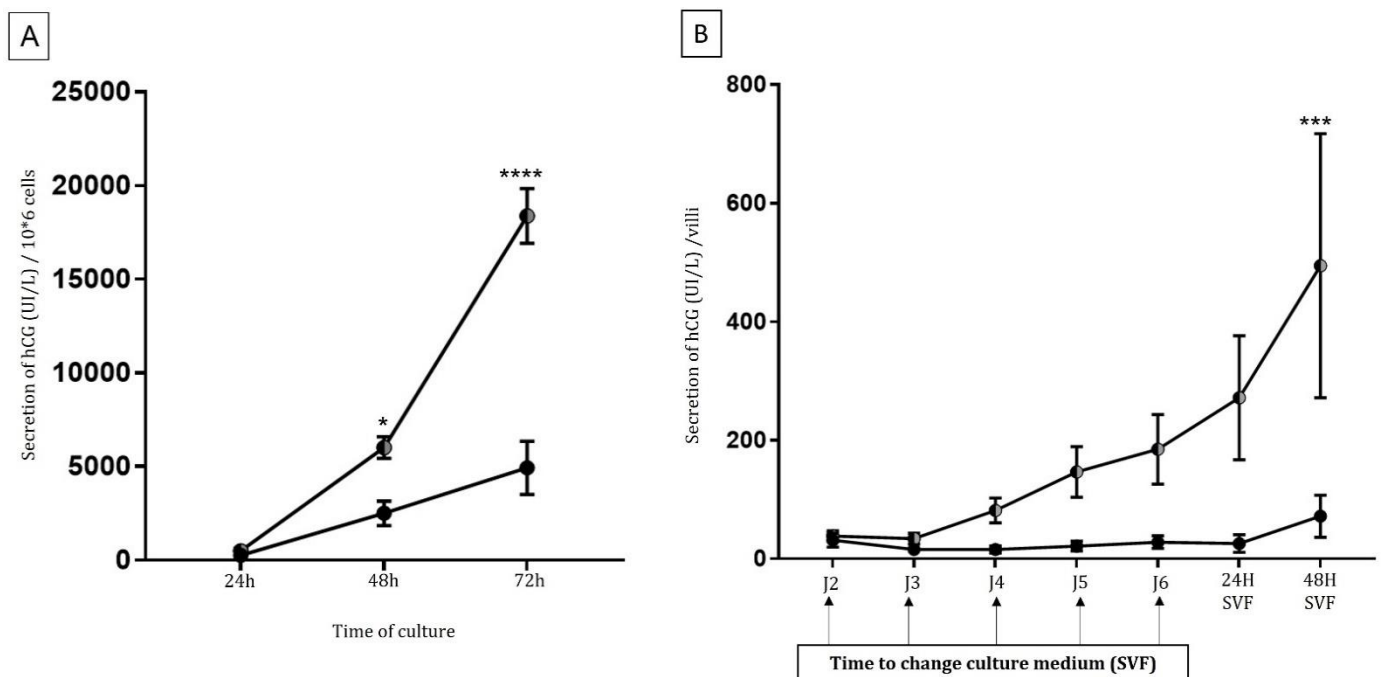


Figure 33: Effect of *in vivo* alcohol on secretion of hCG (human Chorionic Gonadotrophin Hormone) *in vitro* ● : Control n=8; ○ : Alcohol n=5. (A) Graphical representation of secretion of hCG (UI/L)/10⁶cells by VCT's primary culture for 24h-48h or 72h of incubation with SVF medium. Culture medium of each condition were collected and hCG was measured by automate on the Cochin Hospital platform. (B) Graphical representation of secretion of hCG (UI/L) by villi incubated with SVF medium. The six first day, medium was collected and change every day. At the 6th day, for the syncytium renewal, villi were incubated with SVF for 24h or 48h. Culture medium were collected and hCG was measured by automate on the Cochin Hospital platform. Statistical test: ANOVA two way + Sidak's multiple comparisons test were made with Graph Pad® prism 7.0 software; P-value > 0.05; P-value ≤ 0.05 (*); P-value ≤ 0.01 (**); P-value ≤ 0.001 (***); P-value ≤ 0.0001 (****). Statistical result: A) Alcohol vs control 24h= NS; Alcohol vs control 48h=*; Alcohol vs control 72h=****. B) with ANOVA two way+ Sidak's multiple comparison test only Alcohol vs control SVF48h are significant=***, With Multiple t-test + assume consistent SD (α= 0.05%) Alcohol vs control 24h SVF are significant too = * (0.015); Alcohol vs control 48hSVF= ****.

d'exposition à l'alcool *in vivo* (les profils des patientes du groupe « alcool » sont très différents).

Au vu de ce constat particulièrement intéressant, en complément avec les observations faite sur les index de fusion, nous nous sommes posé la question du mécanisme d'action sous-jacent à cette augmentation hormonale d'origine peptidique (puisqu'il ne s'agit pas d'une augmentation de production par un nombre de syncytiums plus élevé, lui-même étant diminué par l'alcool *in vivo*). Dans un premier temps nous avons donc étudié l'impact de l'alcool sur une hormone stéroïde secrété par le placenta et ayant un récepteur membranaire commun à l'hCG : la progestérone.

c) Impact de l'alcool *in vivo* sur la sécrétion de progestérone

La progestérone (PG) a été dosée dans les surnageant de culture de CTVs issus de placentas témoins « contrôle » ou « alcool » (Figure 34 (A)) et dans les surnageants d'explants villositaires issus de placentas « contrôle » ou « alcool » (Figure 34 (B)) incubés

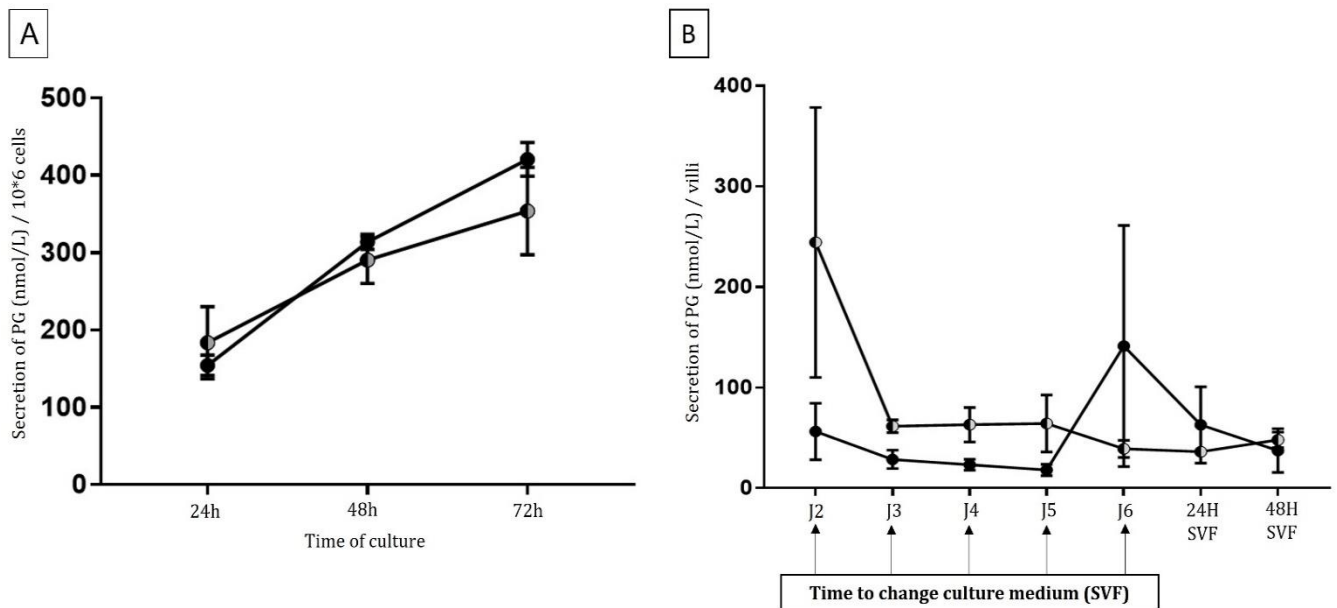


Figure 34 Effect of *in vivo* alcohol on secretion of PG (Progesterone) in vitro ● : Control n=8; ○ : Alcohol n=5. (A) Graphical representation of secretion of PG (nmol/L)/10⁶cells by VCT's primary culture for 24h-48h or 72h of incubation with SVF medium. Culture medium of each condition were collected, and PG was measured by automate on the Cochin Hospital platform. (B) Graphical representation of secretion of PG (nmol/L) by villi incubated with SVF medium. The six first day, medium was collected and change every day. At the 6th day, for the syncytium renewal, villi were incubated with SVF for 24h or 48h. Culture medium were collected, and PG was measured by automate on the Cochin Hospital platform. Statistical test: ANOVA two way + Sidak's multiple comparisons test were made with Graph Pad® prism 7.0 software; P-value > 0.05.

dans du milieu de culture contrôle « SVF ». Que ce soit pour les cellules (A) ou les explants villositaires (B), l'alcool *in vivo* n'a pas d'effet significatif sur la sécrétion de progestérone.

Ces résultats ne nous permettent pas de conclure d'un effet direct/indirect de l'alcool *in vivo* sur le récepteur LH/hCG-R.

Cependant, dans l'introduction il a été évoqué l'implication de différentes voies de signalisation dans la sécrétion d'hCG mais également dans la fonction endocrine de manière plus générale. Par analyses protéomiques effectuées sur des villosités issues des placentas « contrôles » ou « alcool » nous avons pu déterminer l'effet de l'alcool *in vivo* sur une voie de signalisation essentielle à la fonction endocrine : la voie de signalisation des hormones de croissance placentaires (JAK/STAT).

d) Impact de l'alcool *in vivo* sur la voie de signalisation des hormones de croissance

Différentes voies de signalisations sont impliquées dans la fonction endocrinienne placentaire, notamment : la voie de signalisation des hormones de croissance (d'autres voies de signalisation de la fonction endocrine possèdent un rôle primordial dans le métabolisme placentaire et ont été étudiées dans cette partie (cf « impact de l'alcool sur le métabolisme placentaire »).

Les profils d'expression protéique des villosités placentaires des patientes « contrôles » et « alcool » ont été évalués par chromatographie CSX et spectrométrie de masse (TIMS-TOF™). Cette analyse a fait l'objet d'une prestation externe sur la plateforme Protéom'IC de l'Hôpital Cochin. Pour l'analyse, les villosités issues de n=5 placentas « contrôles » et n=5 placentas « alcool » ont été utilisées pour identifier l'impact de l'alcool *in vivo* sur la voie de signalisation des hormones de croissance. En analysant les résultats obtenus par le spectromètre de masse et les statistiques associées effectuée par les logiciels MAXQUANT™ et Perseus™, le logiciel Ingenuity™ nous permet de cartographier les protéines exprimées différemment dans le réseau fonctionnel des voies de signalisation déjà connues par le logiciel. Le logiciel Ingenuity™ peut également prédire l'activation ou la désactivation des protéines régulatrices en amont ou en aval des protéines significativement impactées par l'alcool *in vivo*. Ces prédictions dépendent de la p-value et du Fold-Change (FC) de chacune des protéines mais également de la p-value et du z-score de l'ensemble de la voie.

La voie de signalisation des hormones de croissance est significativement impactée par l'alcool (z-score=0, p-value = 6.60E-03) (Cf Table 1A en annexe) (Figure 35 (A)). Les expressions de quatre protéines, dans cette voie, ont été modifiées par l'alcool (Figure 35

(B)). Les expressions protéiques relatives de la PDK1 (*3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1*) et des IGFALS (*Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit*) des villosités « alcool » ont été significativement diminuées par rapport aux villosités « contrôle ». Les expressions protéiques relatives de STAT5A (*Signal transducer and activator of transcription 5A*) et de RPS6KA5 (*Ribosomal protein S6 kinase alpha 5*) des villosités « alcool » ont été significativement augmentées par rapport aux villosités « contrôle ». Avec ces résultats statistiquement significatifs, le logiciel Ingenuity™ peut prédire l'activation ou l'inhibition d'acteurs en amont ou en aval de ces quatre protéines. L'expression protéique de PDK1 est significativement diminuée par l'alcool *in vivo*, de sorte que la signalisation PI3K/AKT est également prédite comme étant diminuée. A l'inverse, parce que l'expression protéique de RPS6KA5 est nécessaire pour la régulation de STAT3 et parce qu'elle est augmentée comme l'expression de STAT5A, dans le cas de l'alcool *in vivo*, Ingenuity™ prédit que toute la voie est activée par l'alcool *in vivo* (Figure 35 (A)). Enfin, l'expression de IGFALS est diminuée, et pour cette voie, le score z est nul même si la p-value <0,05 est significative (Annexe 2).

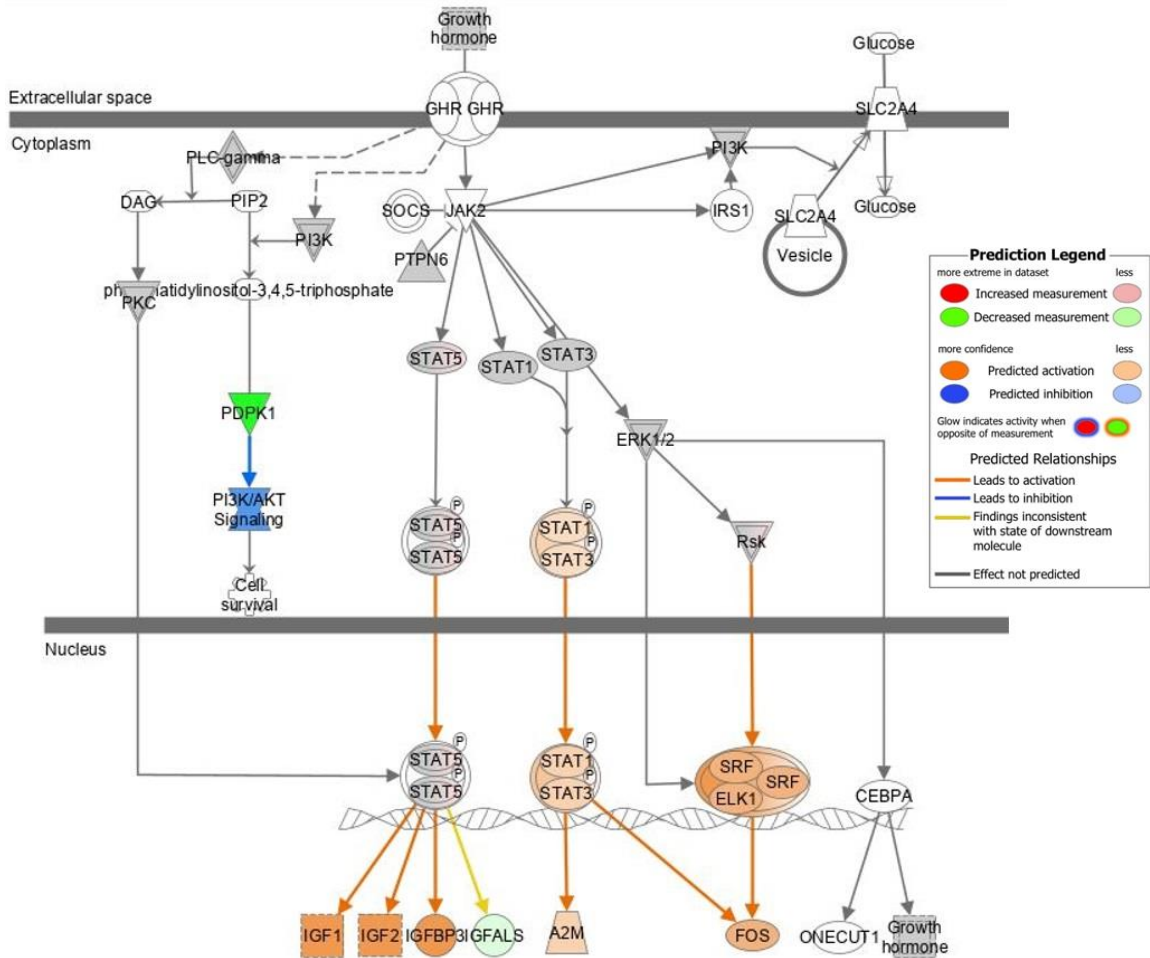
De manière intéressante, le logiciel Ingenuity™ nous permet également, *via* sa banque de données internes « *diseases and functions* », de croiser les résultats en protéines différentielles obtenues lors de nos analyses (alcool versus contrôle) avec les fonctions et pathologies connues du logiciel. Cette étude permet de voir quelles fonctions et pathologies seraient potentiellement impactées par l'alcool *in vivo*, de connaître le nombre de protéines impliquées dans chacune des fonctions ou chacune des pathologies et d'avoir la prédiction d'activation de ces fonctions/pathologies. De manière intéressante les fonctions/pathologies peuvent être regroupées par catégorie plus générale (avec une p-value commune témoignant de l'impact de l'alcool sur l'ensemble de la catégorie mais sans z-score) ou regardées séparément (p-value, z-score et prédiction d'activation si z-score < ou >2).

Ainsi, cette étude nous permet de mettre en évidence l'impact de l'alcool sur les troubles du système endocrinien regroupant 21 fonctions/pathologies (Tableau 6). Chacune de ces fonctions/pathologies est impactée significativement par l'alcool *in vivo* (p-value<0.05), cependant seulement 5 ont un z-score calculable et positif (c'est-à-dire que l'ensemble des altérations protéiques de la voie par l'alcool sont cohérentes avec une activation de la totalité de la fonction). Le z-score de ces fonctions/pathologies n'étant néanmoins pas

supérieur à 2 ou inférieur à -2, l'activation de ces voies n'est pas significativement prédite. Au total nous avons retrouvés les expressions protéiques de 225 protéines communes à des troubles du système endocrinien qui seraient altérées par l'alcool *in vivo*.

- ➔ L'ensemble de ces résultats témoignent de l'impact significatif de l'alcool *in vivo* sur la fonction endocrinienne placentaire essentielle au fonctionnement optimal du placenta et au bon développement de l'embryon/du fœtus.
- ➔ Comme nous l'avons décrit dans l'introduction une deuxième fonction est essentielle au bon développement du fœtus : la fonction d'échanges et transport.

A



B

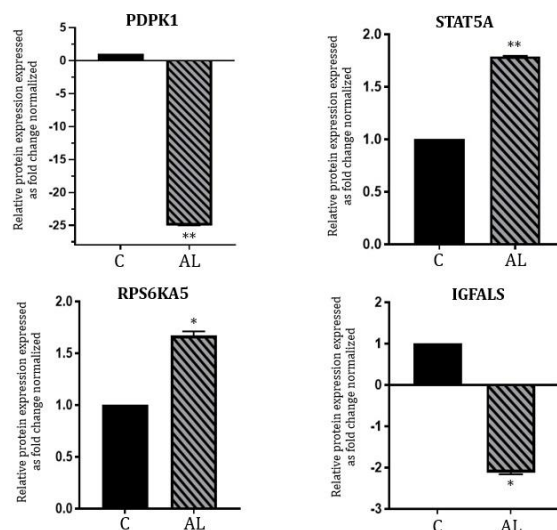


Figure 35 Effect of *in vivo* alcohol on growth hormone canonical pathway. Proteomic analysis of Alcohol Villi ($n=5$) in comparison to Control villi ($n=5$) were made by 3P5 proteom'IC platform at cochin hospital. Analysis of relative expression/ fold change/ z-score and statistical analysis were made by Perseus® Maxquant®, Excel® and Ingenuity® software. (A): schematic representation of effect of *in vivo* alcohol on growth hormone's Ingenuity Canonical Pathways. All legends are described on link: https://qiagen.secure.force.com/KnowledgeBase/articles/Basic_Technical_Q_A/Legend. (B) Graphical representation of *in vivo* alcohol effect on 4 proteins implicated in growth hormone signaling pathway. Relative protein expressions of PDPK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1), STAT5A (Signal transducer and activator of transcription 5A), RPS6KA5 (Ribosomal protein S6 kinase alpha-5), IGFALS (Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit) are expressed in fold change normalized on control. Statistical analyses are made by Student test- P -value > 0.05 ; P -value ≤ 0.05 (*); P -value ≤ 0.01 (**).

Table 6 Effect of *in vivo* alcohol on Endocrine system disorder. Analysis on proteome of Alcohol Villi (n=5) in comparison to Control villi (n=5) were made by 3P5 proteomic platform at cochin hospital. Analysis of relative expression/ fold change/ z-score and statistical analysis were made by Maxquant®, Excel® and Ingenuity® software. Analyse of the impact of alcohol on Endocrine System Disorders. 21 Endocrine functions are affected significantly by *in vivo* alcohol (p-value<0.05. Fisher test); 5 endocrine functions are activated by alcohol (-1.5> z-score <1.5; NS (Student test)). In total, 225 proteins are altered by *in vivo* alcohol.

Name		p-value range	# Molecules			
Endocrine System Disorders		2,61E-03 - 3,45E-22	225			
Categories	T Diseases or Functions Annotation	T p-value	T X Predicted Activation State	T X Activation z-score	T X Molecules	T X # Molecules
Cancer,Endocrine System Disorders,Organi...	Neuroendocrine tumor	2,85E-04		0,609	↑ACSL5, ↑AEBP1, ↑ALOX5, ↑A...	all 67 67
Cancer,Endocrine System Disorders,Organi...	Endocrine gland tumor	8,54E-22		0,839	↑A1BG, ↑AASDHPT, ↑ABCD3, ...	all 216 216
Cancer,Endocrine System Disorders,Organi...	Abdominal neuroendocrine tumor	1,12E-03		1,000	↑ACSL5, ↑ARID1A, ↑CD44, ↑CD...	all 27 27
Cancer,Endocrine System Disorders,Organi...	Nonpituitary endocrine tumor	1,95E-21		1,191	↑A1BG, ↑AASDHPT, ↑ABCD3, ...	all 211 211
Endocrine System Disorders,Gastrointesti...	Diabetes mellitus	2,61E-03		1,491	↑ABCD3, ↑ACAA1, ↑AEBP1, ↑A...	all 38 38
Cancer,Endocrine System Disorders,Organi...	Thyroid gland tumor	3,45E-22			↑A1BG, ↑AASDHPT, ↑ABCD3, ...	all 210 210
Cancer,Endocrine System Disorders,Organi...	Thyroid carcinoma	6,40E-22			↑A1BG, ↑AASDHPT, ↑ABCD3, ...	all 209 209
Cancer,Endocrine System Disorders,Organi...	Endocrine carcinoma	1,15E-21			↑A1BG, ↑AASDHPT, ↑ABCD3, ...	all 214 214
Cancer,Endocrine System Disorders,Gastro...	Pancreatic tumor	3,46E-06			↑ABCD3, ↑ARID1A, ↑BAIAP2, ...	all 73 73
Cancer,Endocrine System Disorders,Gastro...	Pancreatic carcinoma	1,48E-05			↑ABCD3, ↑ARID1A, ↑BAIAP2, ...	all 61 61
Cancer,Endocrine System Disorders,Gastro...	Pancreatic cancer	1,99E-05			↑ABCD3, ↑ARID1A, ↑BAIAP2, ...	all 63 63
Cancer,Endocrine System Disorders,Organi...	Ovarian tumor	2,58E-05			↑A1BG, ↑AEBP1, ↑AFM, ↑AKTIP, ...	all 51 51
Cancer,Endocrine System Disorders,Organi...	Ovarian cancer	2,68E-05			↑A1BG, ↑AEBP1, ↑AFM, ↑AKTIP, ...	all 50 50
Cancer,Endocrine System Disorders,Gastro...	Pancreatic adenocarcinoma	2,88E-04			↑ABCD3, ↑ARID1A, ↑BAIAP2, ...	all 54 54
Cancer,Endocrine System Disorders,Organi...	Ovarian adenocarcinoma	3,30E-04			↑AEBP1, ↑AFM, ↑AKTIP, ↑ALD...	all 41 41
Cancer,Endocrine System Disorders,Organi...	Ovarian carcinoma	5,02E-04			↑AEBP1, ↑AFM, ↑AKTIP, ↑ALD...	all 42 42
Cancer,Endocrine System Disorders,Organi...	Extrapancreatic neuroendocrine tumor	5,03E-04			↑ACSL5, ↑AEBP1, ↑ALOX5, ↑A...	all 65 65
Endocrine System Disorders,Organismal In...	Benign thyroid nodule	5,90E-04			↑APOA1, ↑CTSB, ↑GC, ↑HIBADH	all 4 4
Cancer,Endocrine System Disorders,Gastro...	Pancreatic ductal adenocarcinoma	8,76E-04			↑ABCD3, ↑ARID1A, ↑BAIAP2, ...	all 51 51
Cancer,Endocrine System Disorders,Organi...	Ovarian serous tumor	1,29E-03			↑AEBP1, ↑AFM, ↑ARID1A, ↑CC...	all 23 23
Endocrine System Disorders,Gastrointesti...	Autoimmune pancreatitis	2,11E-03			↑APOA1, ↑CAPG, ↑GC	all 3 3

B. La fonction d'échanges et transports intra-placentaires

La majorité des échanges et transports à l'interface fœto-placentaire sont localisés au niveau de la villosité chorale au contact du sang maternel dans l'espace intervilloux (Figure 11). Comme cela a été décrit dans l'introduction, les échanges peuvent se faire passivement ou par des transporteurs/canaux (transport facilité ou actif). Pour réaliser cette étude nous avons donc étudié l'expression protéique de différents transporteurs dans les villosités chorales « alcool » issues de patientes ayant consommé de l'alcool *in vivo* en comparaison avec des villosités issues de patientes « contrôles », constituant les deux groupes étudiés. Les profils d'expression protéique des villosités placentaires des patientes « contrôles » et « alcool » ont été évalués par chromatographie CSX et spectrométrie de masse (TIMS-TOF™). Cette analyse a fait l'objet de la même prestation externe sur la plateforme Protéomique de l'Hôpital Cochin. Pour l'analyse, les mêmes villosités issues de n=5 placentas « contrôles » et n=5 placentas « alcool » ont été utilisées pour identifier les transporteurs dont l'expression protéique est altérée par l'alcool *in vivo*. Les résultats obtenus par chromatographie ont été analysés statistiquement par les logiciels MAXQUANT™ et Perseus™. Les analyses de Fold Change et les Tableaux 7-8-9-10-11-12 ont été réalisées sur Excel et *via* Ingenuity™ et Graphpad Prism™. Enfin les fonctions et localisations de chacun des transporteurs impactés par l'alcool *in vivo* ont été décrites en matchant les banques de données de PUBMED avec celles d'UNIPROT.

Chaque Table est alors constituée ainsi : l'identifiant UNIPROT, le nom commun au logiciel Ingenuity™ suivi par celui d'UNIPROT (qui peut être différent parfois), les fonctions dans lesquelles est impliqué le transporteur d'après les données de la littérature ainsi que sa localisation subcellulaire. Ensuite le nombre de villosités placentaires (sur n=5) exprimant la protéine est indiqué pour les deux groupes (il est important car si le nombre de villosités exprimant la protéine n'est pas satisfaisant (ex trois pour un groupe- deux pour le second groupe) la p-value (test de Fisher sur les données « existantes ») est automatiquement non significative, peu importe que le Fold Change (Test de Student entre les valeurs de LFQ disponibles) soit significatif. De plus, il est à noter qu'une p-value à 0.01 et un FC de 25 en valeur absolue a été automatiquement attribué dans le cas où seulement une villosité ou aucune (0) exprime la protéine pour un groupe contre n=5 ou 4 pour l'autre groupe. Pour exemple, si une protéine X est exprimée par n=5 placentas « contrôles » mais seulement exprimée par une villosité « alcool » alors les valeurs de FC= -25 et la p-value=0.01** ont été attribuées. Enfin les deux dernières colonnes de la Table sont le FC et la p-value expérimentale.

Les analyses de transporteurs ont été divisées en deux sous-groupes pour améliorer la lecture des Tables :

- Les transporteurs SLC (solute carriers) (e)
- Les transporteurs ATPbinding et les transporteurs de lipides, vitamines, acides-aminés etc. (f)

e) Impact de l'alcoolisation *in vivo* sur les transporteurs SLC (premier sous-groupe de transporteurs)

L'expression protéique de 22 transporteurs SLC est impactée par l'alcool *in vivo* (Tableaux 7 et 8). L'expression protéique de SLC19A3, SCL30A1, SLC9A3R1, SLCO2B1 et SLC16A2 est significativement diminuée par l'exposition à l'alcool *in vivo* en termes de FC et la p-value est significative. L'expression protéique de SLC38A2, SLC25A6, SLC25A5, SLC25A3, SLC25A11, SLC25A35, SLC29A6 est significativement diminuée par l'exposition à l'alcool *in vivo* en termes de FC mais la p-value n'est pas significative. A l'inverse l'expression protéique de SLC19A2, SLC30A7, SLC26A2, SLC35E1 est significativement augmentée par l'exposition à l'alcool *in vivo* en termes de FC et la p-value est significative. L'expression

protéique de SLC39A11, SLC27A4, SLC35A3, SLC18B1 est également augmentée par l'exposition à l'alcool *in vivo* en termes de FC mais la p-value n'est pas significative. Deux protéines n'ont ni le FC ni la p-value significative mais ont néanmoins été indiquées dans les Tableaux 7 et 8 : la protéine SLCO2A1 qui n'est exprimée que par trois sur cinq des villosités issues de placentas « alcool » (et n'est pas exprimée du tout par les villosités « contrôles ») et la protéine SLC7A2 qui est exprimée par trois sur cinq des villosités « contrôles » mais n'est exprimée que par une villosité « alcool ».

f) Impact de l'alcoolisation *in vivo* sur les transporteurs ATPbinding, les transporteurs de lipides, vitamines, acides-aminés.

L'expression protéique de 39 protéines de transport (hors transporteurs SLC) est impactée par l'alcool *in vivo* (Tableaux 9-10-11-12). L'expression protéique de SEC22A, HBD, GC, ATP5MF, TF, APOA4, APOA1, AFM est significativement diminuée par l'exposition à l'alcool *in vivo* en termes de FC et la p-value est significative. L'expression protéique de SFXN1, VAMP8, TIMM9, SERPINA7, PGRMC2, LBP, HPX, HBZ, HBE1, GOSR1, COG6, BET1, ATP2C1, ATP6V1E1, APOH, APOE, ALB est significativement diminuée par l'exposition à l'alcool *in vivo* en termes de FC mais la p-value n'est pas significative. A l'inverse l'expression protéique de NUP214, COG7, COG1, ABCD3, NUP37, COPG2 est significativement augmentée par l'exposition à l'alcool *in vivo* en termes de FC et la p-value est significative. L'expression protéique de CIZ1, SEC24B, P4HA2, FABP4, EIF2D, ATP2A3, ABCC1, APOB est également augmentée par l'exposition à l'alcool *in vivo* en termes de FC mais la p-value n'est pas significative.

g) Analyse de la fonction de transport moléculaire

De la même manière que pour la fonction endocrine la banque de données « *diseases and functions* » du logiciel Ingenuity™ nous permet de croiser les résultats en protéines différentielles obtenues lors de nos analyses avec les fonctions et pathologies connues du logiciel pour la fonction de transport moléculaire.

Cette étude nous permet d'observer l'impact de l'alcool sur les transports moléculaires regroupant 8 fonctions/pathologies (Tableau 13). Chacune de ces fonctions/pathologies est impactée significativement par l'alcool *in vivo* (p-value<0.05). Cependant, seule la fonction « transport de molécule » possède un z-score calculable et négatif (-1.09) (c'est-à-dire que l'ensemble des altérations protéiques de la voie par l'alcool sont cohérentes

avec une inactivation de la totalité de la fonction). Le z-score de cette fonction n'étant néanmoins pas supérieur à 2 ou inférieur à -2, l'activation de ces voies n'est pas significativement prédite. Au total les expressions protéiques de 49 protéines communes à la fonction de transport de molécules sont altérées par l'alcool *in vivo*.

Table 7- Impact of in vivo alcohol on SLC transporter protein. Proteomic analysis of "Alcohol" villi (n=5) in comparison to "Control" villi (n=5) were made by 3P5 proteom I/C platform at cochin hospital. Analysis of relative expression/ fold change/ z-score and statistical analysis were made by MAXQUANT®, Perseus™ and Excel® software. Statistical analyses are made by Student test (-1.5 ≤ fold change ≤ 1.5) and Fisher test (P-value > 0.05; P-value ≤ 0.05 (*); P-value ≤ 0.01 (**); P-value ≤ 0.001 (***)). P-value ≤ 0.0001 (****). It's indicated if the SLC are **upregulated** or **downregulated** with significant p-value; if the p-value is no significant but fold change are significant the up or down regulations are noted in black.

ID	IPA NAME	Nom UNIPROT	Fonctions	Localisation	Nombre de placentas expriment la protéine sur n=5 "CONTROL"	Nombre de placentas expriment la protéine sur n=5 "ALCOOL"	Altération de l'expression protéique des placentas "ALCOOL" par rapport aux placentas "CONTROL"	Fold Change	p-value
SLC7A2	solute carrier family 7 member 2	Cationic amino acid transporter 2	Transporteur d'acides aminés (arginine, lysine, ornithine) Pourrait jouer un rôle dans l'activation alternative des macrophages via le rôle de transport d'arginine.	Membrane cellulaire	3	1	↗	1.15	1.0E+00 NS
SLC38A2	solute carrier family 38 member 2	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 2	Transporteur d'acide aminé sodium dépendant (alanine/ glutamine/ glycine/ l-serine) Pourrait jouer un rôle dans le transport des acides aminés à la barrière hémato-encéphalique et dans l'apport de nutriments maternels au fœtus par le placenta. Aussi impliqué dans le transport des neurotransmetteurs et la régulation de la réponse cellulaire au stress.	Membrane cellulaire	3	2	↘	-1.65	1.3E-01 NS
SLC19A3	solute carrier family 19 member 3	Thiamine transporter 2	Transporteur transmembranaire de thiamine (absorption) exprimé de manière ubiquitaire et dépourvu d'activité de transport du folate. Une mutation du gène peut engendrer un syndrome des ganglions de la base sensible à la biotine (BBGD) qui peut évoluer vers une encéphalopathie chronique.	Membrane cellulaire	5	5	↘	-3.32	1.3E-02 *
SLC19A2	solute carrier family 19 member 2	Thiamine transporter 1	Transporteur de thiamine. Une mutation du gène peut engendrer un syndrome d'anémie mégaloblastique sensible à la thiamine (TRMA).	Membrane cellulaire	1	4	↗	25.00	1.0E-02 **
SLC39A11	solute carrier family 39 member 11	Zinc transporter ZIP11	Transporteur transmembranaire de zinc.	Membrane cellulaire + appareil de Golgi	3	2	↗	1.73	5.7E-01 NS
SLC30A7	solute carrier family 30 member 7	Zinc transporter 7	Transporteur de zinc du cytoplasme dans l'appareil de Golgi / permet l'efflux cellulaire de zinc	Membrane cellulaire	4	4	↗	2.15	1.0E-02 **
SLC30A1	solute carrier family 30 member 1	Zinc transporter 1	Prédit pour activer l'activité inhibitrice des canaux calciques et l'activité de Transporteur transmembranaire de zinc. Prédit comme acteur antérieur et pendant le développement embryonnaire in utero. Importateur de calcium/ fonction détoxifiatrice de cadmium/ régulation négative de la sécrétion de neurotransmetteurs	Membrane cellulaire	4	1	↘	-25.00	1.0E-02 **
SLC25A6	solute carrier family 25 member 6	ADP/ATP translocase 3	Antiport qui médie l'importation d'ADP dans la matrice mitochondriale pour la synthèse d'ATP et l'exportation d'ATP pour alimenter la cellule/ également impliqué dans le découplage mitochondrial et l'induction de l'apoptose.	Membrane mitochondriale	5	5	↘	-1.55	7.3E-02 NS
SLC25A5	solute carrier family 25 member 5	ADP/ATP translocase 2	Antiport qui transloque l'ADP du cytoplasme vers la matrice mitochondriale et l'ATP de la matrice mitochondriale vers le cytoplasme. Egalement impliqué dans le découplage mitochondrial et l'activité des pores de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP). Il a été démontré que la suppression de son expression in vitro induit l'apoptose et inhibe la croissance tumorale.	Membrane mitochondriale	5	5	↘	-1.58	7.2E-02 NS
SLC25A3	solute carrier family 25 member 3	Phosphate carrier protein, mitochondrial	Transport des groupes phosphate du cytosol vers la mitochondrie. Peut jouer un rôle de régulation du pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP).	Membrane mitochondriale	5	5	↘	-1.58	6.8E-02 NS
SLC25A11	solute carrier family 25 member 11	Mitochondrial 2-oxoglutarate/ malate carrier protein	Catalyse le transport du 2-oxoglutarate à travers la membrane mitochondriale et joue un rôle important dans plusieurs processus métaboliques, y compris la navette malate-aspartate, la navette oxoglutarate/isocitrate, dans la gluconeogenèse du lactate et dans le métabolisme de l'azote. Maintient les événements de fusion et de fission mitochondriales/ impliqué dans la régulation de l'apoptose (Par similarité).	Membrane mitochondriale	5	5	↘	-1.79	6.2E-02 NS

Table 8 Impact of in vivo alcohol on SLC transporter protein. Proteomic analysis of "Alcohol" Villi (n=5) in comparison to "Control" villi (n=5) were made by 3P5 proteom¹C platform at cochlin hospital. Analysis of relative expression/ fold change/ z-score and statistical analysis were made by MAXQUANT®, Perseus™ and Excel® software. Statistical analyses are made by Student test (-1.5 ≤ fold change ≤ 1.5) and Fisher test (P-value > 0.05; P-value ≤ 0.05 (*); P-value ≤ 0.01 (**); P-value ≤ 0.001 (***)). P-value ≤ 0.0001 (****). It's indicated if the SLC are **upregulated** or **downregulated** with significant p-value; if the p-value is no significant but Fold change are significant the up or down regulations are noted in black.

ID	IPANAME	Nom UNIPROT	Fonctions	Localisation	Nombre de placentas exprimant la protéine sur n=5	Nombre de placentas exprimant la protéine sur n=5 "ALCOOL"	Alération de l'expression protéique des placentas aux placentas "CONTROLE"	Fold Change	p-value
SLC25A35	solute carrier family 25 member 35	Solute carrier family 25 member 35	Transporteur mitochondrial très exprimé large dans les testicules et l'endomètre. Ils sont également très largement exprimés dans le système nerveux central.	Membrane mitochondriale	5	4	↘	-1.88	1.9E-01
SLC27A4	solute carrier family 27 member 4	Long-chain fatty acid transport protein 4	Transporteur d'acide gras. Impliqué dans la translocation des acides gras à longue chaîne à travers la membrane plasmique grâce à son activité acyl-CoA ligase. Joue un rôle dans la formation de la barrière épidermique. Requis pour l'absorption des graisses au début de l'embryogenèse (par similitude).	Membrane de l'appareil de golgi	3	5	↗	1.55	2.5E-01
SLC35A3	solute carrier family 35 member A3	UDP-N-acetylglucosamine transporter	Transporteur d'uridine diphosphate-N-acétylglucosamine (UDP-GlcNAc) dans l'appareil de Golgi.	Membrane de l'appareil de golgi	3	4	↗	1.55	3.9E-01
SLC9A3R1	SLC9A3 regulator 1	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1	Joue un rôle dans la régulation de l'activité et de la localisation subcellulaire du transporteur SLC9A3. Nécessaire pour la phosphorylation médiée par l'AMPe et l'inhibition de SLC9A3. Scaffold protéine qui relie les protéines de la membrane plasmique aux membres de la famille ezrin/moesin/radixin et aide ainsi à les lier au cytosquelette d'actine et à réguler leur expression de surface. Il est impliqué dans la signalisation de Wnt et HTR4 sur les microvillosités (par similitude). La protéine interagit également avec les protéines qui fonctionnent comme des liaisons entre les protéines membranaires intégrales et les protéines cytosquelettiques. Impliqué dans la capacité du sperme. Peut participer à la régulation de l'homéostasie du chlore et du bicarbonate dans les spermatozoïdes.	Membrane plasmique	5	5	↘	-1.90	3.1E-02
SLC26A2	solute carrier family 26 member 2	Sulfate transporter	Transporteur de sulfate. Peut jouer un rôle dans la formation osseuse endochondrale (essentiel dans le cartilage pour la sulfatation des protéoglycanes et l'organisation de la matrice). Activité de transporteur transmembranaire d'oxalate	Membrane plasmique	1	5	↗	25.00	1.0E-02
SLC29A1	solute carrier family 29 member 1 (Augustine blood group)	Equilibrative nucleoside transporter 1	Activité de transporteur transmembranaire et recapture de neurotransmetteurs. Médié à la fois l'afflux et l'efflux de nucléosides à travers la membrane hémato-encéphalique (rôle de régulation). Activité de transporteur transmembranaire AMP et activité de transporteur transmembranaire de nucléosides.	Membrane cellulaire	4	5	↘	-1.98	6.9E-02
SLC02A1	solute carrier organic anion transporter family member 2A1	Solute carrier organic anion transporter family member 2A1	Transporteur de prostaglandine : PGD2, PGE1, PGE2 et PGF2A.	Membrane cellulaire	0	3	↗	1.00	1.0E+00
SLC02B1	solute carrier organic anion transporter family member 2B1	Solute carrier organic anion transporter family member 2B1	Transporteur de prostaglandines PGD2, PGE1, PGE2, mais également de leucotriène C4, le thromboxane B2 et l'hoprost. Impliqué dans la régulation de l'absorption placentaire des stéroïdes sulfatés.	Membrane cellulaire	4	0	↘	-25.00	1.0E-02
SLC35E1	solute carrier family 35 member E1	Q96K37	Antiport - Transporteur putatif	membrane cytoplasmique	5	5	↗	1.53	4.8E-02
SLC18B1	solute carrier family 18 member B1	MFS-type transporter SLC18B1	La fonction de ce transporteur n'est pas connue. Expression ubiquitaire dans le cerveau	Membrane cellulaire	3	5	↗	1.69	2.2E-01
SLC16A2	solute carrier family 16 member 2	Monocarboxylate transporter 8	Transporteur d'hormones thyroïdiennes très actif et spécifique. Stimule l'absorption cellulaire de la thyroxine (T4), de la triiodothyronine (T3), de la triiodothyronine inverse (rT3) et de la diiodothyronine. Ne transporte pas de Leu, Phe, Trp ou Tyr	Membrane cellulaire	5	1	↘	-25.00	1.0E-02**

Table 9- Impact of in vivo alcohol on transporter protein. Proteomic analysis of "Alcohol" Villi (n=5) in comparison to "Control" villi (n=5) were made by 3P5 proteom 1C platform at cochin hospital. Analysis of relative expression/ fold change/ z-score and statistical analysis were made by MAXQUANT®, Perseus™ and Excel® software. Statistical analyses are made by Student test (-1.5 ≤ fold change ≤ 1.5) and Fisher test (P-value > 0.05; P-value ≤ 0.05 (*); P-value ≤ 0.01 (**); P-value ≤ 0.001 (***)). P-value ≤ 0.0001 (****). It's indicated if the SIC are **upregulated** or **downregulated** with significant p-value; if the p-value is no significant but Fold change are significant the up or down regulations are

ID	IPA NAME	Nom UNIPROT	Fonctions	Localisation	Nombre de placentas exprimant la protéine sur n=5 "CONTROL"	Nombre de placentas exprimant la protéine sur n=5 "ALCOOL"	Altération de l'expression protéique des placentas "ALCOOL" par rapport aux placentas "CONTROL"	Fold Change	p-value
SEC22A	SEC22 homolog A vesicle trafficking protein	Vesicle- trafficking protein SEC22A	Impliqué dans le transport de molécule entre le RE et l'appareil de golgi	membrane cytoplasmique	5	1	↘	-25.00	1.0E-02 **
SFXN1	sideroflexin 1	sideroflexin 1	Transporteur de sérine mitochondriale. Transporteur aussi d'autres acides aminés, tels que l'alanine.	Membrane mitochondriale	5	5	↘	-2.04	6.4E-02 NS
NUF214	nucleoporin 214	Nuclear pore complex protein Nup214	A un rôle critique dans le transport nucléocytoplasmique.	Membrane nucléaire	5	5	↗	1.76	4.3E-02 *
HBD	hemoglobin subunit delta	hemoglobin subunit delta	Impliqué dans le transport d'oxygène.	Membrane du cytosol + retrouvé dans la membrane des héroglobines	5	5	↘	-4.76	2.0E-02 **
GC	GC vitamin D binding protein	GC vitamin D binding protein	Impliqué dans le transport et le stockage de la vitamine D, la capture de la G-actine extracellulaire, l'amélioration de l'activité chimiotactique des neutrophiles dans l'inflammation et l'activation des macrophages.	transporteur libre-secrété dans le milieu extra cellulaire	5	5	↘	-2.37	3.5E-03 **
COG7	component of oligomeric golgi complex 7	Conserved oligomeric Golgi complex subunit 7	Nécessaire pour le bon fonctionnement de l'appareil de golgi	Membrane de l'appareil de golgi	5	5	↗	1.75	2.3E-02 *
COG1	component of oligomeric golgi complex 1	Conserved oligomeric Golgi complex subunit 1	Nécessaire pour le bon fonctionnement de l'appareil de golgi	Membrane de l'appareil de golgi	5	4	↗	2.12	4.2E-02 *
ATP5MF	ATP synthase membrane subunit f	ATP synthase subunit f, mitochondrial	ATP synthase membranaire mitochondriale. Production d'ATP à partir de l'ADP en présence d'un gradient de protons à travers la membrane.	Membrane mitochondriale	5	5	↘	-1.70	4.2E-02 *
ABCD3	ATP binding cassette subfamily D member 3	ATP-binding cassette subfamily D member 3	Transporteur ATP-dépendant qui catalyse le transport des acides gras à chaîne longue (LCFA)-CoA, des acides dicarboxyliques-CoA, des acides gras à chaîne longue ramifiée-CoA et des acides biliaires du cytosol à la lumière du peroxysoxe pour la bêta-oxydation. Possède des activités d'acyl-CoA thioestérase grasse et d'ATPase. Hydrolyse probablement les acyl-CoAs gras en acides gras libres avant leur transport ATP-dépendant en peroxysoxes (par similitude).	membrane peroxysoxe	5	5	↗	1.59	1.2E-02 *
VAMP8	vesicle associated membrane protein 8	Vesicle-associated membrane protein 8	Les SNAREs (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment protein receptors), récepteurs protéiques solubles, sont des protéines essentielles à la fusion des membranes cellulaires. Les SNAREs localisés sur des membranes opposées s'assemblent pour former un complexe trans-SNAREs, un faisceau étendu parallèle à quatre alpha-hélicoïdaux qui entraîne la fusion membranaire. VAMP8 est un SNAREs impliqué dans l'autoplagie par le contrôle direct de la fusion membranaire de l'autophagosome avec la membrane du lysosome. Également requis pour la sécrétion de granules denses dans les plaquettes. Joue un rôle dans la sécrétion enzymatique régulée dans les cellules adhérentes pancréatiques (par similitude). Impliqué dans la fusion homotypique des endosomes précoces et tardifs (par similitude). Participe également à l'activation de la réponse antivirale à l'interféron de type I par un mécanisme dépendant de TRIM6.	Membrane plasmique-endosome-lysosome	5	5	↘	-1.61	5.9E-02 NS

Table 10 Impact of in vivo alcohol on transporter protein. Proteomic analysis of "Alcohol" villi (n=5) in comparison to "Control" villi (n=5) were made by 3P5 proteom/IC platform at cochin hospital. Analysis of relative expression/fold change/z-score and statistical analysis were made by MAXQUANT®, Perseus™ and Excel® software. Statistical analyses are made by Student test (-1.5 ≤ fold change ≤ 1.5) and Fisher test (P-value > 0.05; P-value ≤ 0.05 (*); P-value ≤ 0.01 (**); P-value ≤ 0.001 (***)). P-value ≤ 0.0001 (****). It's indicated if the SLC are **upregulated** or **downregulated** with significant p-value; if the p-value is no significant but Fold change are significant the up or down regulations are

ID	IPA NAME	Nom UNIPROT	Fonctions	Localisation	Nombre de placentas exprimant la protéine sur n=5 "CONTROL"	Nombre de placentas exprimant la protéine sur n=5 "ALCOOL"	Altération de l'expression protéique des placentas "ALCOOL" par rapport aux placentas "CONTROL"	Fold Change	p-value
CIZ1	CDKN1A interacting zinc finger protein 1	Cip1-interacting zinc finger protein	Pourrait réguler la localisation subcellulaire de CIP/WAF1	Membrane nucléaire	1	3	↗	1,70	1,0E+00 NS
TMM9	translocase of inner mitochondrial membrane 9	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim9	Chaperon mitochondrial intermembranaire qui participe à l'importation et à l'insertion de protéines transmembranaires multipass dans la membrane interne mitochondriale. Agit comme une protéine de type chaperon qui protège les précurseurs hydrophobes de l'aggrégation et les guide à travers l'espace intermembranaire mitochondrial.	Transmembrane mitochondrial	5	5	↘	-1,53	1,4E-01 NS
TF	transferrin	Serotransferrin	Protéines de transportant le fer qui peuvent lier deux ions Fe ³⁺ en association avec la liaison d'un anion, généralement du bicarbonate. Il est responsable du transport du fer des sites d'absorption et de dégradation de l'hème vers ceux de stockage et d'utilisation. La transferrine sérique peut également jouer un rôle supplémentaire dans la stimulation de la prolifération cellulaire	transporteur libre-secrété dans le milieu extra cellulaire	5	5	↘	-1,60	3,6E-02 *
SERPINA7	serpin family A member 7	Thyroïdine-binding globulin	Majeur transporteur d'hormones thyroïdes dans le sérum.	transporteur libre-secrété dans le milieu extra cellulaire	5	3	↘	-2,26	7,7E-02 NS
SEC24B	SEC24 homolog B, COP1 coat complex component	Protein transport protein Sec24B	Composant du complexe protéique du pelage II (COPII) qui favorise la formation de vésicules de transport à partir du réticulum endoplasmique (ER).	membrane du RE et membrane cytoplasmique	5	5	↗	1,53	1,4E-01 NS
P4HA2	prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 2	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 2	Catalyse la formation post-traductionnelle de séquences 4-hydroxyproline in -Xaa-Pro-Gly- dans les collagènes et autres protéines.	membrane du RE	5	4	↗	1,76	8,3E-02 NS
PGRC2	progesterone receptor membrane component 2	Membrane-associated progesterone receptor component 2	Requis pour le maintien de l'histoarchitecture utérine et de la durée de vie reproductive normale de la femme (par similitude). Peut servir de récepteur universel de la progestérone dans l'utérus. Chaperon intracellulaire d'hème requis pour la livraison d'hème labile, ou de signalisation, au noyau (par similitude). Joue un rôle dans la fonction adipocytaire et l'homéostasie systémique du glucose.	Membrane nucléaire et du RE	5	5	↘	-1,59	1,1E-01 NS
NUP37	nucleoporin 37	Nucleoporin Nup37	Composant du sous-complexe Nup107-160 du complexe de pores nucléaires (NPC). Requis pour l'assemblage d'un NPC fonctionnel. Le sous-complexe est également requis pour la fixation des microtubules kinétochores, la progression mitotique et la ségrégation chromosomique	Membrane nucléaire	5	5	↗	1,63	2,6E-03 **
LBP	Lipopolysaccharide binding protein	Lipopolysaccharide-binding protein	Joue un rôle dans la réponse immunitaire innée. Se lie au lipide A sur une fraction de lipopolysaccharides bactériens (LPS), un glycolipide présent dans la membrane externe de toutes les bactéries à Gram négatif. Agit comme un activateur d'affinité pour le CD14, facilitant son association avec le LPS. Favorise la libération de cytokines en réponse à un lipopolysaccharide bactérien.	transporteur libre-secrété dans le milieu extra cellulaire	5	5	↘	-2,17	1,3E-01 NS
HPX	hemopexin	hemopexin	Lie l'hème et le transporte vers le foie pour sa dégradation et son absorption.	transporteur libre-secrété dans le milieu extra cellulaire	5	5	↘	-2,11	5,4E-02 NS
HBZ	hemoglobin subunit zeta	hemoglobin subunit zeta	La chaîne zéta est une chaîne de type alpha de l'hémoglobine embryonnaire des mammifères	transporteur libre-secrété dans le milieu extra cellulaire	5	5	↘	-2,15	1,2E-01 NS

Table 11- Impact of in vivo alcohol on transporter protein. Proteomic analysis of "Alcohol" Vili (n=5) in comparison to "Control" vili (n=5) were made by 3P5 proteom¹C platform at cochon hospital. Analysis of relative expression/ fold change/ z-score and statistical analysis were made by MAXQUANT[®], Perseus[™] and Excel[®] software. Statistical analyses are made by Student test (-1.5 ≤ fold change ≤ 1.5) and Fisher test (P-value > 0.05; P-value ≤ 0.05 (*); P-value ≤ 0.01 (**); P-value ≤ 0.001 (***)). P-value ≤ 0.0001 (****). It's indicated if the SLC are **upregulated** or **downregulated** with significant p-value; if the p-value is no significant but fold change are significant the up or down regulations are

ID	IPA NAME	Nom UNIPROT	Fonctions	Localisation	Nombre de placentas exprimant la protéine sur n=5 "CONTROL"	Nombre de placentas exprimant la protéine sur n=5 "ALCOOL"	Altération de l'expression protéique des placentas "ALCOOL" par rapport aux placentas "CONTROL"	Fold Change	p-value
HBE1	hemoglobin subunit epsilon 1	hemoglobin subunit epsilon 1	La chaîne epsilon est une chaîne de type bêta de l'hémoglobine embryonnaire précoce des mammifères	transporteur libéré secrété dans le milieu extra cellulaire	5	5	↘	-2.18	6.6E-02 NS
GOSR1	golgi SNAP receptor complex member 1	Golgi SNAP receptor complex member 1	Transport du RE vers l'appareil de Golgi et intra-Golgi. Il appartient à une superfamille de protéines appelées t-SNAREs ou récepteur de protéine d'attachement soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor). Peut jouer un rôle protecteur contre la cytotoxicité induite par le peroxyde d'hydrogène dans des conditions apparues en glutation dans les cellules neuronales en réglant les niveaux de ROS intracellulaires via l'inhibition de p38 MAPK (MAPK1, MAPK12, MAPK13 et MAPK14). Joue un rôle physiologique important dans la fusion vésiculaire-Golgi de transport de VLDL et donc dans l'administration de VLDL au cis-Golgi hépatique	Membrane de l'appareil de golgi	5	5	↘	-1.63	1.8E-01 NS
FABP4	fatty acid binding protein 4	Fatty acid binding protein, adipocyte	Transport des lipides dans les adipocytes. Lise à la fois les acides gras à chaîne longue et l'acide rétinolique.	Membrane nucléaire et cytosol	5	5	↗	1.73	2.0E-01 NS
EIF2D	eukaryotic translation initiation factor 2D	Eukaryotic translation initiation factor 2D	Facteur d'initiation de la traduction capable de délivrer l'ARNi au site P du ribosome eucaryote de manière indépendante du GTP. Son activité dans la liaison de l'ARNi avec les sous-unités 40S. En plus de son rôle dans l'initiation, peut favoriser la libération d'ARNi et d'ARNm désacylés à partir de sous-unités recyclées des 40S à la suite de la dissociation médiée par ABCG1 de complexes ribosomaux post-termination en sous-unité.	membrane cytoplasmique et cytosolique	5	5	↗	1.51	1.9E-01 NS
COPG2	COP1 coat complex subunit gamma 2	Coatomer subunit gamma-2	Le coatomère est un complexe protéique cytosolique qui se lie aux motifs de di-lysine et s'associe de manière réversible aux vésicules de Golgi non revêtues de clathrine, qui médient en outre le transport des protéines biosynthétiques de l'ER, via le Golgi jusqu'au réseau trans-Golgi. Ce complexe est nécessaire pour le bourgeonnement des membranes de Golgi et est essentiel pour le transport rétrograde du Golgi à l'ER des protéines marquées à la lysine. Le complexe influence également l'intégrité structurale du Golgi, ainsi que le traitement, l'activité et le recyclage endocyttaire des récepteurs LDL (par similitude)	Membrane de l'appareil de golgi - membrane cytoplasmique/ cytosolique	5	5	↗	1.58	4.8E-02 *
COC6	component of oligomeric Golgi complex 6	Conserved oligomeric Golgi complex subunit 6	Nécessaire pour le bon fonctionnement de l'appareil de golgi	membrane de l'appareil de golgi	4	4	↘	-1.52	1.9E-01 NS
BET1	Bet1 golgi vesicular membrane trafficking protein	BET1 homolog	Nécessaire pour le transport vésiculaire de l'ER vers le Golgi. Fonctionne comme un SNAREs impliqué dans le processus d'amarage des vésicules dérivées de l'ER avec la membrane cis-Golgi (par similitude).	membrane de l'appareil de golgi et de l'ER	5	5	↘	-1.54	8.2E-02 NS
ATP2C1	ATPase secretory pathway Ca2+ transporting 1	Calcium-transporting ATPase type 2C member 1	Pompe entraînée par l'ATP qui alimente l'appareil de Golgi en ions Ca2+ et Mn2+. Dans un cycle catalytique, acquiert des ions Ca2+ ou Mn2+ du côté cytoplasmique de la membrane et les délivre côté luminal. Le transfert d'ions à travers la membrane est couplé à l'hydrolyse de l'ATP et est associé à une phosphorylation transitoire. Participe à l'absorption des ions Ca2+ et Mn2+ dans la réserve de Golgi des neurones de l'hippocampe et régule le trafic de protéines requis pour la polarité neuronale (par similitude).	Membrane trans-Golgi	5	5	↘	-1.50	1.6E-01 NS
ATP2A3	sarcolemmal/endoplasmic reticulum Ca2+ transporting 3	Calcium-transporting ATPase 3	Catalyse l'hydrolyse de l'ATP couplée au transport du calcium. Transporte les ions calcium du cytosol dans la lumière du réticulum sarcoplasmique/endoplasmique. Contribue à la séquestration du calcium impliqué dans l'excitation/contraction musculaire	Membrane RE + nucléaire	5	4	↗	1.79	2.3E-01 NS
ATP6V1E1	ATPase H+ transporting V1 subunit E1	V-type proton ATPase subunit E 1	Sous-unité du complexe V1 de la vacuole (H+) - ATPase (V-ATPase), une enzyme composée d'un complexe périphérique (V1) qui hydrolyse l'ATP et d'un complexe membranaire intégral (V0) qui transloque les protons. La V-ATPase est responsable de l'acidification et du maintien du pH des compartiments intracellulaires et, dans certains types de cellules, est ciblée sur la membrane plasmique, où elle est responsable de l'acidification de l'environnement extracellulaire	membrane plasmique	5	5	↘	-1.70	9.5E-02 NS

Table 22 Impact of in vivo alcohol on transporter protein. Proteomic analysis of "Alcohol" VIII (n=5) in comparison to "Control" VIII (n=5) were made by 3P5 proteom IC platform at cochin hospital. Analysis of relative expression/ fold change/ z-score and statistical analysis were made by MAXQUANT®, Persuas™ and Excel® software. Statistical analyses are made by Student test (-1.5 ≤ fold change ≤ 1.5) and Fisher test (P-value > 0.05; P-value ≤ 0.05 (*); P-value ≤ 0.01 (**); P-value ≤ 0.001 (***)), P-value ≤ 0.0001 (****). It's indicated if the SLC are **upregulated** or **downregulated** with significant p-value; if the p-value is no significant but Fold change are significant the up or down regulations are

ID	IPA NAME	Nom UNIPROT	Fonctions	Localisation	Nombre de placentas exprimant la protéine sur n=5 placentas "CONTROLE"	Nombre de placentas exprimant la protéine sur n=5 placentas "ALCOOL"	Altération de l'expression protéique des placentas "ALCOOL" par rapport aux placentas "CONTROLE"	Fold Change	P-value
ABCC1	ATP binding cassette subfamily C member 1	Multidrug resistance-associated protein 1	Médecine le transport ATP-dépendant du glutathion, du leucotriène C4, de l'estradiol-17-β-oligonurone, du métronidazole, des médicaments antituberculeux et d'autres xénobiotiques; Hydrolyse l'ATP avec une faible efficacité. Catalyse l'exportation de sphingosine 1-phosphate à partir de mastocytes. Participe à la réponse inflammatoire en permettant l'exportation du leucotriène C4 à partir de cellules synthétisant le leucotriène C4 (Par similarité).	membrane cellulaire	5	4	↗	1.65	5,1E-02 NS
APOH	apolipoprotein H	Beta-2-glycoprotein 1	Se lie à divers types de substances chargées négativement telles que l'héparine, les phospholipides et le sulfate de dextrane. Peut empêcher l'activation de la cascade intrinsèque de la coagulation sanguine en se liant aux phospholipides à la surface des cellules endommagées	transporteur libre-secrété dans le milieu extra cellulaire	5	5	↘	-2.23	1,3E-01 NS
APOE	apolipoprotein E	Apolipoprotein E	APOE est une apolipoprotéine qui fonctionne principalement dans le transport lipidique médié par les lipoprotéines entre les organes via le plasma et les fluides interstitiels. En tant que tel, APOE s'associe aux lipoprotéines de très basse densité (VLDL) et aux lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL) mais présente une liaison préférentielle aux lipoprotéines de haute densité (HDL). Il se lie également à un large éventail de récepteurs cellulaires, y compris le récepteur LDL/LDLR, les protéines liées aux récepteurs LDL, LRP1, LRP2 et LRP8. Enfin, l'APOE a également une activité de liaison à l'héparine et les protéoglycanes de l'héparane-sulfate à la surface des cellules, une propriété qui favorise la capture et l'absorption par les cellules des lipoprotéines contenant de l'APOE. L'APOE est également impliquée dans la biosynthèse par le foie des VLDL, ainsi que leur absorption par les tissus périphériques assurant l'apport de triglycérides et le stockage d'énergie dans les tissus musculaires, cardiaques et adipeux. L'APOE joue un rôle important dans le transport des lipides dans le système nerveux central, régulant la survie et la germination des neurones. L'APOE est également impliquée dans deux étapes du transport inverse du cholestérol: le transport médié par le HDL du cholestérol des tissus périphériques vers le foie, et joue ainsi un rôle important dans l'homéostasie du cholestérol. Premièrement, il est fonctionnellement associé à ABCA1 dans la biogénèse des HDL dans les tissus; deuxièmement, il est enrichi en HDL circulants et médie leur absorption par les hépatocytes. APOE peut également jouer un rôle dans la régulation de la transcription par un mécanisme dépendant des récepteurs et indépendant du cholestérol, qui active MAP3K12 et une voie de transduction du signal MARK non canonique qui se traduit par une transcription améliorée de l'APP médiée par l'APP-1.	transporteur libre-secrété dans le milieu extra cellulaire	5	5	↘	-1.83	7,7E-02 NS
APOB	apolipoprotein B	Apolipoprotein B-100	L'apolipoprotéine B est un constituant protéique majeur des LDL et des VLDL. Fonctionne comme un signal de reconnaissance pour la liaison cellulaire et l'internalisation des particules de LDL par le récepteur.	transporteur libre-secrété dans le milieu extra cellulaire + Cytoplasme/ cytosol	5	5	↗	1.61	5,4E-01 NS
APOA4	apolipoprotein A4	Apolipoprotein A-IV	Peut jouer un rôle dans la sécrétion et le catabolisme des VLDL. Requis pour l'activation efficace de la lipoprotéine lipase par ApoC-II; activateur puissant de LCAT. ApoA-IV est un composant majeur des HDL.	transporteur libre-secrété dans le milieu extra cellulaire	5	5	↘	-1.58	9,4E-03 **
APOA1	apolipoprotein A1	Apolipoprotein A-1	Participe au transport inverse du cholestérol des tissus vers le foie pour l'excrétion en favorisant l'efflux de cholestérol des tissus et en agissant comme cofacteur de la lécithine cholestérol acyltransférase (LCAT). Dans le cadre du complexe SPAP, active la motilité des spermatozoïdes.	transporteur libre-secrété dans le milieu extra cellulaire	5	5	↘	-1.70	2,6E-02 *
ALB	albumin	albumin	Lie l'eau, le Ca ²⁺ , le Na ⁺ , le K ⁺ , les acides gras, les hormones, la bilirubine et les médicaments (probablement). Transporteur majeur de zinc dans le plasma, se lie généralement à environ 80% de tout le zinc plasmatique. Transporteur majeur du calcium et du magnésium dans le plasma, lie environ 45% du calcium et du magnésium circulants dans le plasma (par similarité).	transporteur libre-secrété dans le milieu extra cellulaire	5	5	↘	-1.51	7,1E-02 NS
AFM	afamin	afamin	Essentiel pour la solubilité et l'activité des membres de la famille des Wnt, y compris WNT1, WNT2B, WNT3, WNT3A, WNT5A, WNT7A, WNT7B, WNT8, WNT9A, WNT9B, WNT10A et WNT10B. Peut être impliquée dans le transport de la vitamine secrétée dans le milieu E à travers la barrière hémato-encéphalique	transporteur libre-secrété dans le milieu extra cellulaire	5	5	↘	-2.68	1,3E-02 *

Table 13- Effect of *in vivo* alcohol on Molecular Transport function. Analysis on proteome of Alcohol Villi (n=5) in comparison to Control villi (n=5) were made by 3P5 proteom'IC platform at cochin hospital. Analysis of relative expression/ fold change/ z-score and statistical analysis were made by Perseus®, Maxquant®, Excel® and Ingenuity® software. Analyse of the impact of alcohol on molecular transport: 8 molecular transport functions are affected significantly by *in vivo* alcohol (p-value<0.05, Fisher test); One of these functions is downregulated by alcohol (-> z-score <2; NS (Student test)). In total, 49 proteins of transport are altered by *in vivo* alcohol.

Name	p-value range	# Molecules
Molecular Transport	1,99E-03 - 1,19E-08	49

Categories	Diseases or Functions Annotation	p-value	Predicted Activation State	Activation z-score	Molecules	# Molecules
Molecular Transport	Transport of molecule	1,33E-04		-1,069	↑ABCD3, ↑ACSL4, ↑ACSL5, ↑A... ↓AFM, ↓APOA1, ↓GC, ↓SLC19A3	49
Molecular Transport,RNA Trafficking	Transport of mRNA	1,19E-08			↑FMR1, ↑HTT, ↑MAGOH, ↑ND... ↓MAGOH, ↑NDC1, ↑NUP214, ↑...	11
Molecular Transport,RNA Trafficking	Nuclear export of mRNA	4,89E-07			↓MAGOH, ↑NDC1, ↑NUP214, ↑...	9
Lipid Metabolism,Molecular Transport,Sm...	Import of lipid	7,03E-04			↑ABCD3, ↓APOA1, ↓SLC9A3R1	3
Molecular Transport	Transport of vitamin	8,58E-04			↓AFM, ↓APOA1, ↓GC, ↓SLC19A3	4
Lipid Metabolism,Molecular Transport,Sm...	Transport of oleic acid	1,43E-03			↑ACSL4, ↑ACSL5	2
Lipid Metabolism,Molecular Transport,Sm...	Import of fatty acid	1,99E-03			↑ABCD3, ↓SLC9A3R1	2
Lipid Metabolism,Molecular Transport,Sm...	Transport of cholesterol ester	1,99E-03			↓APOA1, ↓SLC9A3R1	2

- ➔ L'alcool *in vivo* impacte et altère significativement la fonction de transport placentaire.
- ➔ Les transporteurs permettent un grand nombre d'échanges entre la mère et le fœtus indispensable pour le développement du fœtus et participe également à l'équilibre placentaire pour répondre aux différentes fonctions. Cet équilibre est principalement maintenu par la fonction métabolique placentaire.

C. La fonction métabolique

Comme cela a été décrit dans l'introduction, la fonction métabolique joue un rôle essentiel dans le maintien du niveau énergétique des cellules et également dans l'homéostasie placentaire. En effet le métabolisme permet aux cellules de remplir leurs fonctions *via* différentes voies interconnectées (A. Judge et M.S. Dodd, 2020).

h) Impact de l'alcool *in vivo* sur l'activité du métabolisme glucidique

Le métabolisme du glucose, substrat préférentiel, est essentiel pour le fonctionnement des cellules et sa dérégulation est impliqué dans de nombreuses pathologies.

Comme cela a été évoqué précédemment, le logiciel Ingenuity nous permet, *via* sa banque de données internes « *diseases and functions* », de croiser les résultats en protéines différentielles obtenues lors de nos analyses avec les fonctions et pathologies connues du logiciel. De manière intéressante, il est possible de regarder précisément une fonction, les protéines qui y sont dérégulées et d'obtenir un réseau de protéines associé à la fonction.

Par cette fonction nous avons pu étudier l'impact de l'alcool sur le métabolisme du glucose (Figure 36 (A)). Celui-ci est significativement impacté par l'alcool *in utero* sans prédiction d'activation ou inactivation possible (p-value 3.47×10^{-4} , z-score : 0.445) ; 47 protéines impliquées dans le métabolisme du glucose sont impactées significativement avec l'alcool *in vivo* (Figure 36 (B)). De fait l'expression protéique relative de ABCD3, ACAA1, ALDOB, CDK2, COL4A1, COL4A2, CTSB, EIF4BP2, ENPEP, GSK3A, HTT, LAMTOR5, LPIN2, MARK2, NDUFA4, NEBL, PARP14, PEPD, REL, SLC30A7, THOP1 est significativement augmentée dans les villosités « alcool » en comparaison avec les villosités « contrôles ». A l'inverse l'expression protéique relative de AEBP1, APOA1, APOA4, CAPG, CASP4, CD44, CDH11, CLEC14A, GC, GPD2, GRB2, HBD, HLA-DRA, HSD111B1, ITGA2B, LCP1, LGALS3, LSM2, PDPK1, RPL28, SERPINC1, SERPINF1, SHBG, TAP1, TF, THBS1 est significativement diminuée dans les villosités « alcool » en comparaison avec les villosités « contrôles ».

i) Impact de l'alcool sur le métabolisme lipidique

Le métabolisme lipidique, avec l'utilisation des acides gras et le transport du cholestérol est essentiel à l'ensemble des fonctions vitales du placenta (tout comme le glucose) et notamment il est impliqué dans la régulation hormonale.

Comme pour le glucose, Ingenuity™ nous permet d'étudier l'impact de l'alcool *in vivo* sur le métabolisme lipidique et notamment sur celui des acides gras (Tableau 14).

Table 14- Impact of *in vivo* alcohol on Fatty Acid metabolism. Analysis on proteome of Alcohol Villi (n=5) in comparison to Control villi (n=5) were made by 3P5 proteom'IC platform at cochin hospital. Analysis of relative expression/ fold change/ z-score and statistical analysis were made by Maxquant®, Excel® and Ingenuity® software. Table of *in vivo* alcohol effect on 6 proteins implicated in Fatty Acid metabolism. Relative protein expressions of ACAA1, ACADSB, ACSL4, ACSL5, ALDH1B1, AUH are expressed in fold change normalized on control. Statistical analyses are made by Student test (p-value < 0.05) and fisher test (-1.5 < FC > 1.5).

6 molecule(s) associated with Fatty Acid Metabolism at AL_T [Ratio: 6/117 (0,051)] [p-value: 1,12E-03]						
Symbol	Entrez Gene Name	Identifier	Measurement	Expr p-value	Expr False Discovery R...	Expr Fold Change
ACAA1	acetyl-CoA acyltransferase 1	P09110		4,32E-02	7,01E-01	↑1,963
ACADSB	acyl-CoA dehydrogenase short chain	P45954		2,89E-02	6,87E-01	↑2,256
ACSL4	acyl-CoA synthetase long chain	O60488		1,03E-02	6,24E-01	↑1,711
ACSL5	acyl-CoA synthetase long chain	Q9ULC5		3,72E-02	7,01E-01	↑1,507
ALDH1B1	aldehyde dehydrogenase 1 family class B member 1	P30837		5,42E-03	5,87E-01	↑3,231
AUH	AU RNA binding methylglutamate	Q13825		3,60E-02	7,01E-01	↑1,793

Six protéines sont impactées par l'exposition à l'alcool *in vivo*. De fait, l'expression protéique de ACAA1, ACADSB, ACSL4, ACSL5, ALDH1B1, AUH est significativement

augmentée dans les villosités exposées à l'alcool *in vivo* en comparaison aux villosités « contrôles » (avec un FC et une p-value significative).

La voie de signalisation LXR/RXR, régulatrice du métabolisme lipidique, est également impactée par l'alcool (Figure 37 (A)). Dix protéines, dans cette voie, ont été altérées par l'alcool *in vivo*. L'expression protéique relative de GC (Vitamin D-binding protein), APOA4 (Apolipoprotein A-IV), TF (Serotransferrin), SERPINF1 (Serpine Family F member 1/Pigment epithelium-derived factor), APOA1 (Apolipoprotein A-I), RBP4 (Retinol-binding protein 4), APOC1 (Apolipoprotein C-I), A1BG (Alpha-1B-glycoprotein), FDFT1 (Squalene synthase) a été significativement diminuée dans les villosités exposées à l'alcool *in vivo* par rapport aux villosités issues des « contrôles » (Figure 37 (B)). L'expression protéique relative de REL (Proto-oncogene c-Rel) a été significativement augmentée dans les villosités « alcool » par rapport au contrôle (Figure 37 (B)). En raison de ces changements dans l'expression des protéines par l'exposition à l'alcool *in vivo*, Ingenuity™ peut prédire que toute la voie est significativement down-régulée par l'alcool (z-score = -2,449, p-value 3.24×10^{-4}).

De la même manière, la voie PPAR α /RXR, impliquée également dans le métabolisme lipidique, est altérée par l'alcool *in vivo* (Figure 38 (A)). Cinq protéines, dans cette voie, ont été altérées par l'alcool *in vivo*. L'expression protéique relative de ACCA1 (3-ketoacyl-CoA thiolase, peroxisomal) et REL (Proto-oncogene c-Rel) a été significativement augmentée dans les villosités « alcool » par rapport aux villosités contrôle (Figure 38 (B)). L'expression protéique relative de APOA1 (Apolipoprotein A-I), GPD2 (Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial), GRB2 (Growth factor receptor-bound protein 2) a été significativement diminuée dans les villosités exposées à l'alcool *in vivo* par rapport aux villosités issues des « contrôles » (Figure 38 (B)). En raison de ces changements dans l'expression des protéines par l'exposition à l'alcool *in vivo*, Ingenuity™ ne peut pas prédire l'activation ou non de cette voie PPAR α /RXR (score z = -1) ; cependant cette voie est bien significativement altérée par l'alcool *in vivo* (p-value = 4.94×10^{-2}).

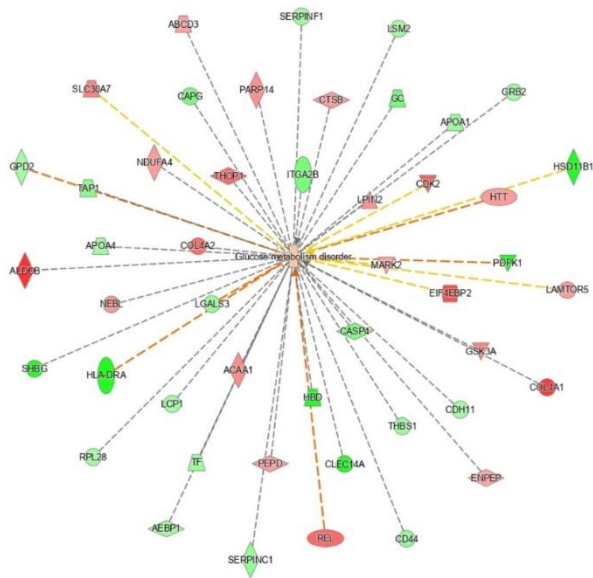


Figure 36- Effect of in vivo alcohol on metabolism of Glucose. Analysis on proteome of Alcohol Villi (n=5) in comparison to Control villi (n=5) were made by 3P5 proteom'IC platform at cochin hospital. Analysis of relative expression/ fold change/ z-score and statistical analysis were made by Perseus®Maxquant®, Excel® and Ingenuity® software. (A): schematic representation of effect of in vivo alcohol on metabolism of glucose Ingenuity display network. All legends are described on link: <https://qiagen.secure.force.com/KnowledgeBase/articles/Basic Technical Q A/Legend>. (B) Table of in vivo alcohol effect on 47 proteins implicated in metabolism of glucose. Relative protein expressions of ABCD3, ACAA1, AEBP1, ALDOB, APOA1, APOA4, CAPG, CASP4, CD44, CDH11, CDK2, CLEC14A, COL4A1, COL4A2, CTSB, EIF4BP2, ENPEP, GC, GPD2, GRB2, GSK3A, HBD, HLA-DRA, HSD111B1, HTT, ITGA2B, LAMTOR5, LCP1, LGALS3, LPIN2, LSM2, MARK2, NDUF44, NEBL, PARP14, PDPK1, PEPD, REL, RPL28, SERPINC1, SERPINF1, SHBG, SLC30A7, TAP1, TF, THBS1, THOP1 are expressed in fold change normalized on control. Statistical analyses are made by Student test- P-value > 0.05; P-value ≤ 0.05 (*); P-value ≤ 0.01 (**); P-value ≤ 0.001 (***); P-value ≤ 0.0001 (****)

Metabolism of glucose				
ID	Expr Fold change	Alteration by alcohol	p-value	Significant score
ABCD3	1,59	↗	0,0123	*
ACAA1	1,96	↗	0,0432	*
AEBP1	-1,59	↘	0,0023	**
ALDOB	25,00	↗	0,0100	**
APOA1	-1,70	↘	0,0257	*
APOA4	-1,58	↘	0,0094	**
CAPG	-2,22	↘	0,0401	*
CASP4	-2,23	↘	0,0470	*
CD44	-1,75	↘	0,0085	**
CDH11	-1,51	↘	0,0022	**
CDK2	2,76	↗	0,0143	*
CLEC14A	-25,00	↘	0,0100	**
COL4A1	3,42	↗	0,0180	*
COL4A2	2,52	↗	0,0245	*
CTSB	1,73	↗	0,0412	*
EIF4BP2	2,99	↗	0,0103	*
ENPEP	1,54	↗	0,0041	**
GC	-2,37	↘	0,0035	**
GPD2	-1,51	↘	0,0203	*
GRB2	-1,57	↘	0,0311	*
GSK3A	2,14	↗	0,0305	*
HBD	-4,76	↘	0,0195	*
HLA-DRA	-6,86	↘	0,0443	*
HSD111B1	-25,00	↘	0,0100	**
HTT	1,70	↗	0,0390	*
ITGA2B	-2,21	↘	0,0083	**
LAMTOR5	1,67	↗	0,0127	*
LCP1	-1,50	↘	0,0281	**
LGALS3	-1,75	↘	0,0160	*
LPIN2	1,89	↗	0,0073	**
LSM2	-1,63	↘	0,0157	*
MARK2	1,59	↗	0,0104	*
NDUF44	1,72	↗	0,0195	*
NEBL	1,78	↗	0,0077	**
PARP14	1,91	↗	0,0129	*
PDPK1	-25,00	↘	0,0129	*
PEPD	1,70	↗	0,0110	*
REL	2,55	↗	0,0236	*
RPL28	-1,52	↘	0,0330	*
SERPINC1	-1,78	↘	0,0014	**
SERPINF1	-1,57	↘	0,0421	*
SHBG	-25,00	↘	0,0100	**
SLC30A7	2,15	↗	0,0102	*
TAP1	-1,95	↘	0,0430	*
TF	-1,60	↘	0,0359	*
THBS1	-1,75	↘	0,0194	*
THOP1	2,63	↗	0,0062	**

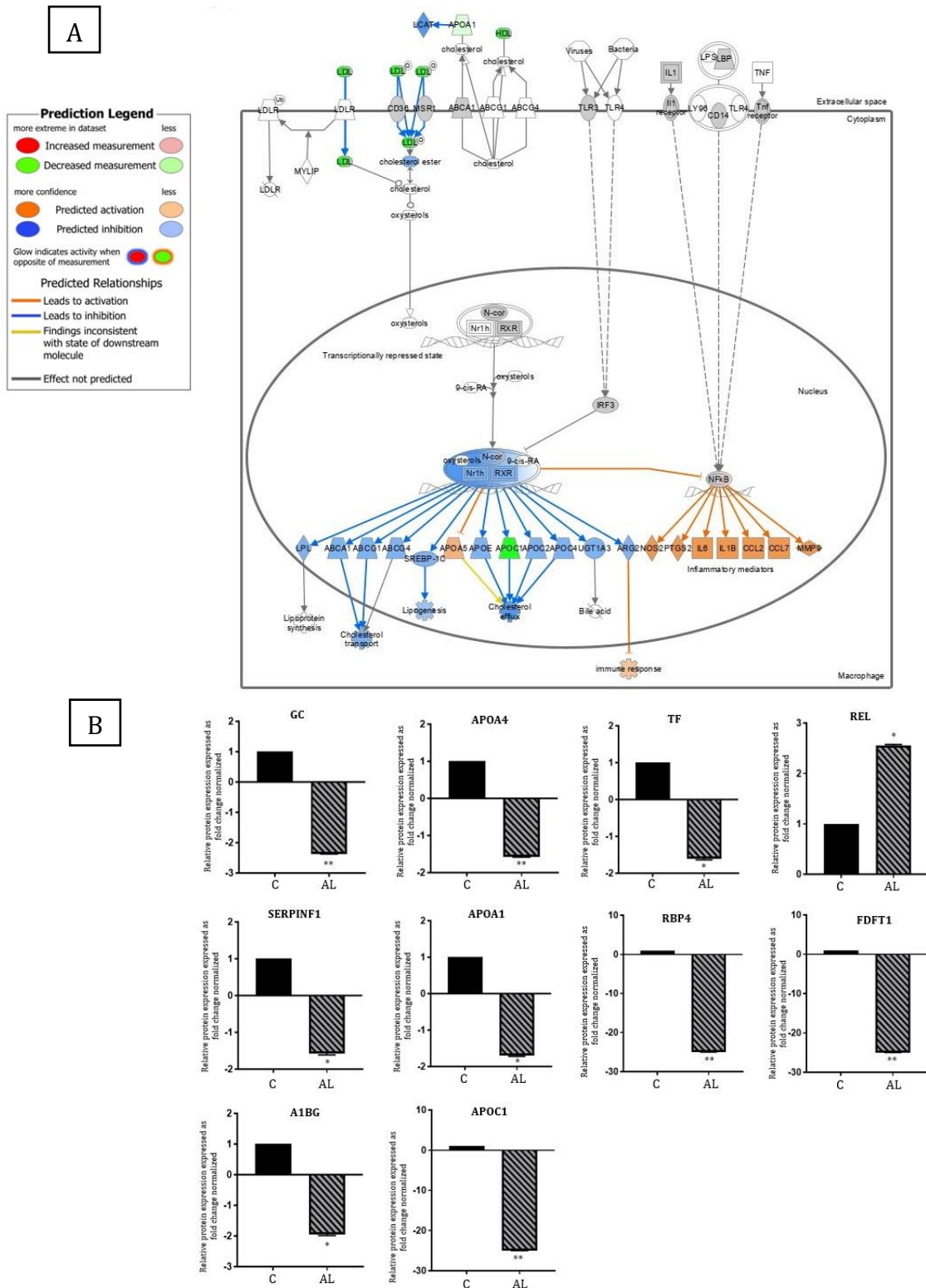
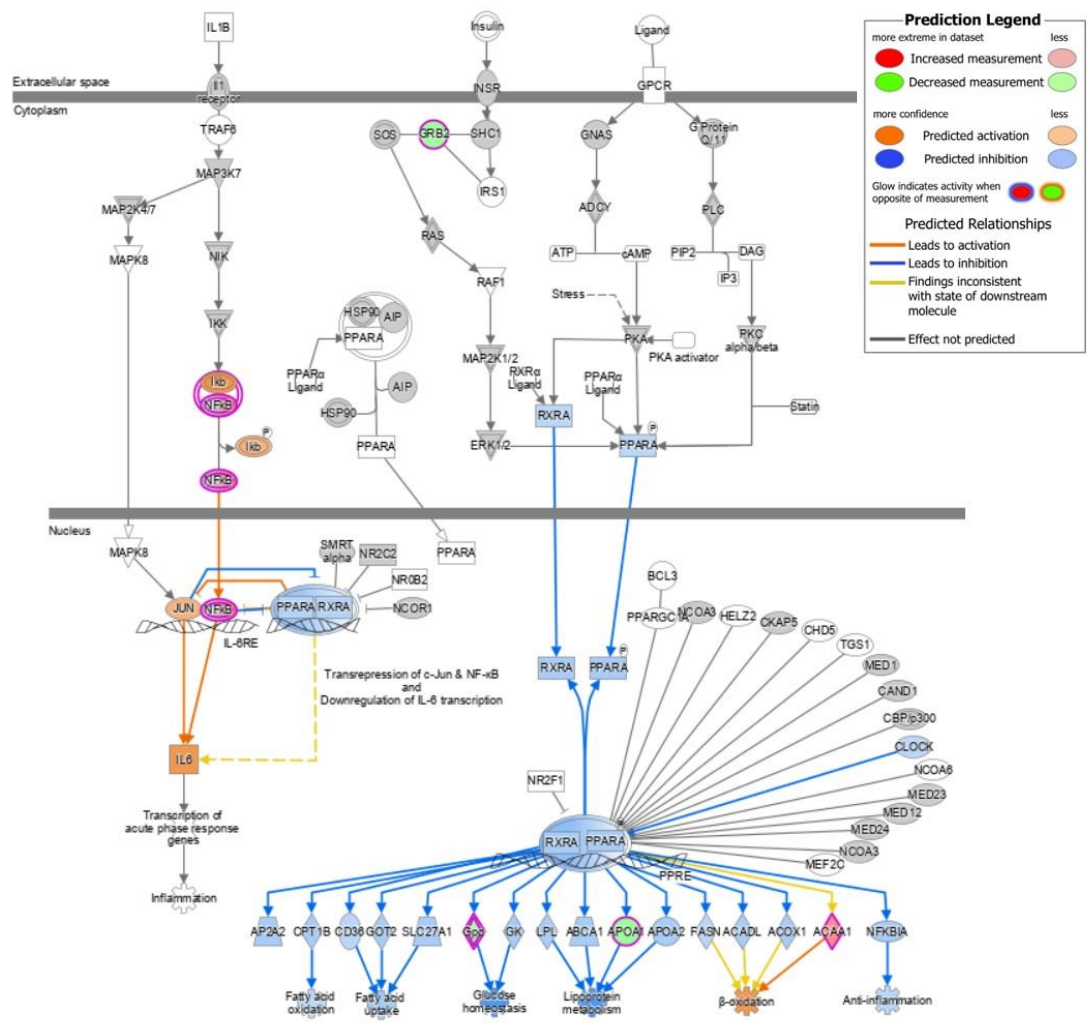


Figure 37- Effect of *in vivo* alcohol on LXR/RXR activation canonical pathway. Analysis on proteome of Alcohol Villi ($n=5$) in comparison to Control villi ($n=5$) were made by 3P5 proteom^{IC} platform at cochin hospital. Analysis of relative expression/ fold change/ z-score and statistical analysis were made by Perseus[®]Maxquant[®], Excel[®] and Ingenuity[®] softwares. (A): schematic representation of effect of *in vivo* alcohol on LXR/RXR Ingenuity Canonical Pathways. All legends are described on link: https://qiagen.secure.force.com/KnowledgeBase/articles/Basic_Technical_Q_A/Legend. (B) Graphical representation of *in vivo* alcohol effect on 10 proteins implicated LXR/RXR signaling pathway. Relative protein expressions of GC (Vitamin D-binding protein), APOA4 (Apolipoprotein A-IV), TF (Serotransferrin), SERPINF1 (Serp Family F member 1/ Pigment epithelium-derived factor), APOA1 (Apolipoprotein A-I), RBP4 (Retinol-binding protein 4), APOC1 (Apolipoprotein C-I), A1BG (Alpha-1B-glycoprotein), REL (Proto-oncogene c-Rel), FDFT1 (Squalene synthase) are expressed in fold change normalized on control. Statistical analyses are made by Student test- P -value > 0.05 ; P -value ≤ 0.05 (*); P -value ≤ 0.01 (**); and Fisher test ($-1.5 < FC < 1.5$)

A



B

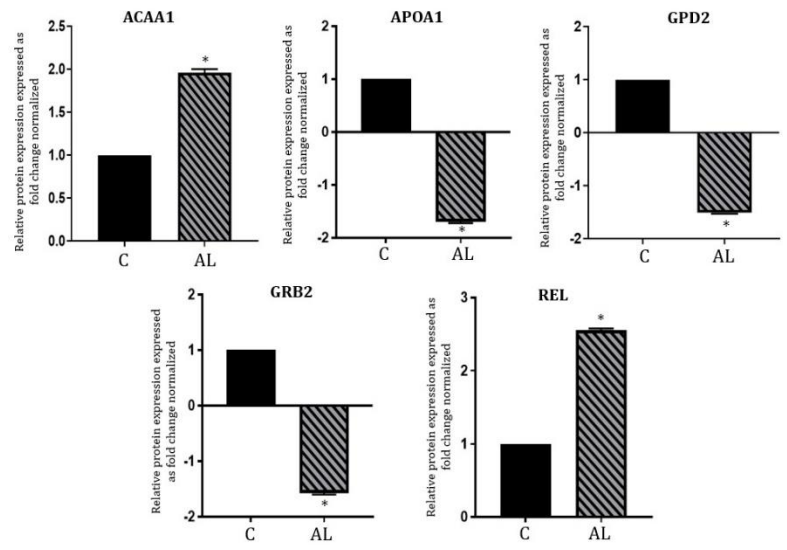


Figure 38 Effect of *in vivo* alcohol on PPAR α /RXR α activation canonical pathway. Analysis on proteome of Alcohol Villi ($n=5$) in comparison to Control villi ($n=5$) were made by 3P5 proteom^{IC} platform at cochlin hospital. Analysis of relative expression/ fold change/ z-score and statistical analysis were made by Perseus[®]Maxquant[®], Excel[®] and Ingenuity[®] softwares. (A): schematic representation of effect of *in vivo* alcohol on PPAR α /RXR α Ingenuity Canonical Pathways. All legends are described on link: https://qiagen.secure.force.com/KnowledgeBase/articles/Basic_Technical_Q_A/Legend. (B) Graphical representation of *in vivo* alcohol effect on 5 proteins implicated PPAR α /RXR α signaling pathway. Relative protein expressions of ACAA1 (3-ketoacyl-CoA thiolase, peroxisomal), APOA1 (Apolipoprotein A-1), GPD2 (Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial), GRB2 (Growth factor receptor-bound protein 2), REL (Proto-oncogene c-Rel) are expressed in fold change normalized on control. Statistical analyses are made by Student test- P -value > 0.05; P -value \leq 0.05 (*); and Fisher test ($-1.5 < FC < 1.5$)

j) Impact de l'alcool sur les voies de signalisation ERK/MAPK et PI3K/AKT

Les voies de signalisation ERK/MAPK et PI3K/AKT sont bien connues pour jouer un rôle clé dans la métabolisme et l'homéostasie intracellulaire. Leur régulation est primordiale pour le bon fonctionnement de l'ensemble des fonctions placentaires.

La voie de signalisation de ERK/MAPK est altérée par l'alcoolisation *in vivo*. Huit protéines, dans cette voie, ont été modifiées par l'alcool (Figure 39 (A)). L'expression protéique relative de BCAR1 (Breast cancer anti-estrogen resistance protein 1), ITGA2 (Integrin alpha-2), RPS6KA5 (Ribosomal protein S6 kinase alpha-5) a été significativement augmentée dans les villosités « alcool » par rapport aux villosités contrôles (Figure 39 (B)). L'expression protéique relative de GRB2 (Growth factor receptor-bound protein 2), ITGA3 (Integrin alpha-3), ITGA2B (Intégrine alpha-IIb), ITGAM (Integrin alpha-M), PPP2R5E (Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit epsilon isoform) a été significativement diminuée dans les villosités « alcool » par rapport aux villosités « contrôles » (Figure 39 (B)). En raison de ces changements dans l'expression des protéines par l'exposition à l'alcool *in vivo*, Ingenuity ne prédit pas d'activation ou d'inactivation globale de cette voie de signalisation par l'alcool (z-score= 0,447 (NS)) mais elle est significativement altérée (p-value= 2.28^{E-02}).

La voie de signalisation de PI3K/AKT est altérée par l'alcoolisation *in vivo*. Dix protéines, dans cette voie, ont été modifiées par l'alcool (Figure 40 (A)). L'expression protéique relative de GSK3A (Glycogen synthase kinase-3 alpha), REL (Proto-oncogene c-Rel), ITGA2 (Integrin alpha-2 significativement augmentée dans les villosités « alcool » par rapport aux contrôles (Figure 40 (B)). Expression protéique relative de PDPK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1), GRB2(Growth factor receptor-bound protein 2), ITGA3 (Integrin alpha-3), ITGA2B (Intégrine alpha-IIb), ITGAM (Integrin alpha-M), IL6ST (Interleukin-6 receptor subunit beta), PPP2R5E (Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit epsilon isoform)) a été significativement diminuées par rapport aux villosités « contrôle » (Figure 40 (B)). Le logiciel Ingenuity™ ne prédit pas d'activation ou d'inactivation significative globale de cette voie de signalisation par l'alcool (z-score = -1,342 (NS)) mais elle est significativement altérée (p-value= 4.36^{E-03}).

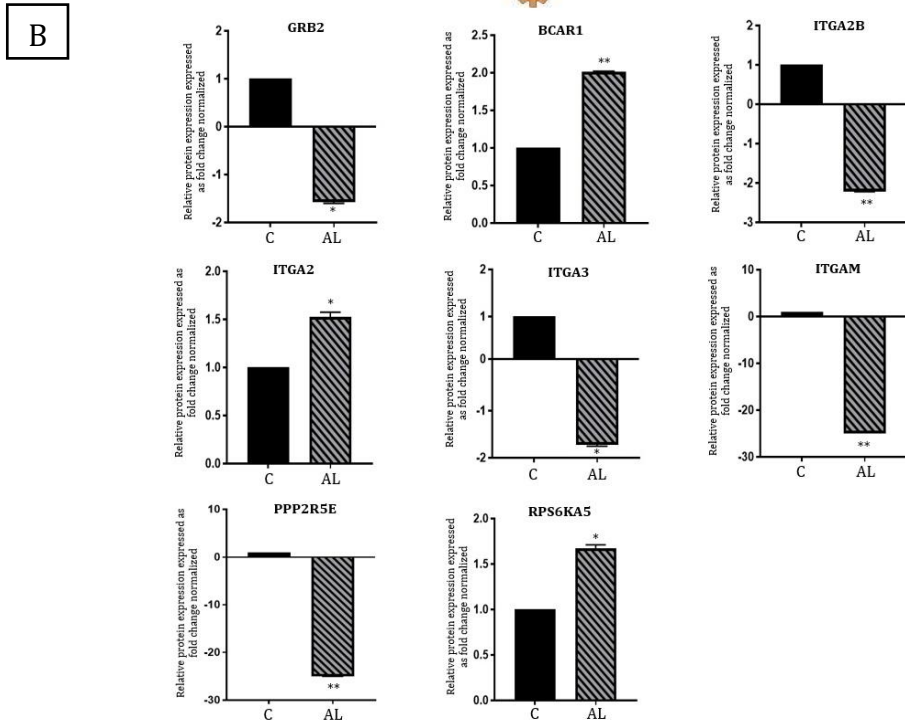
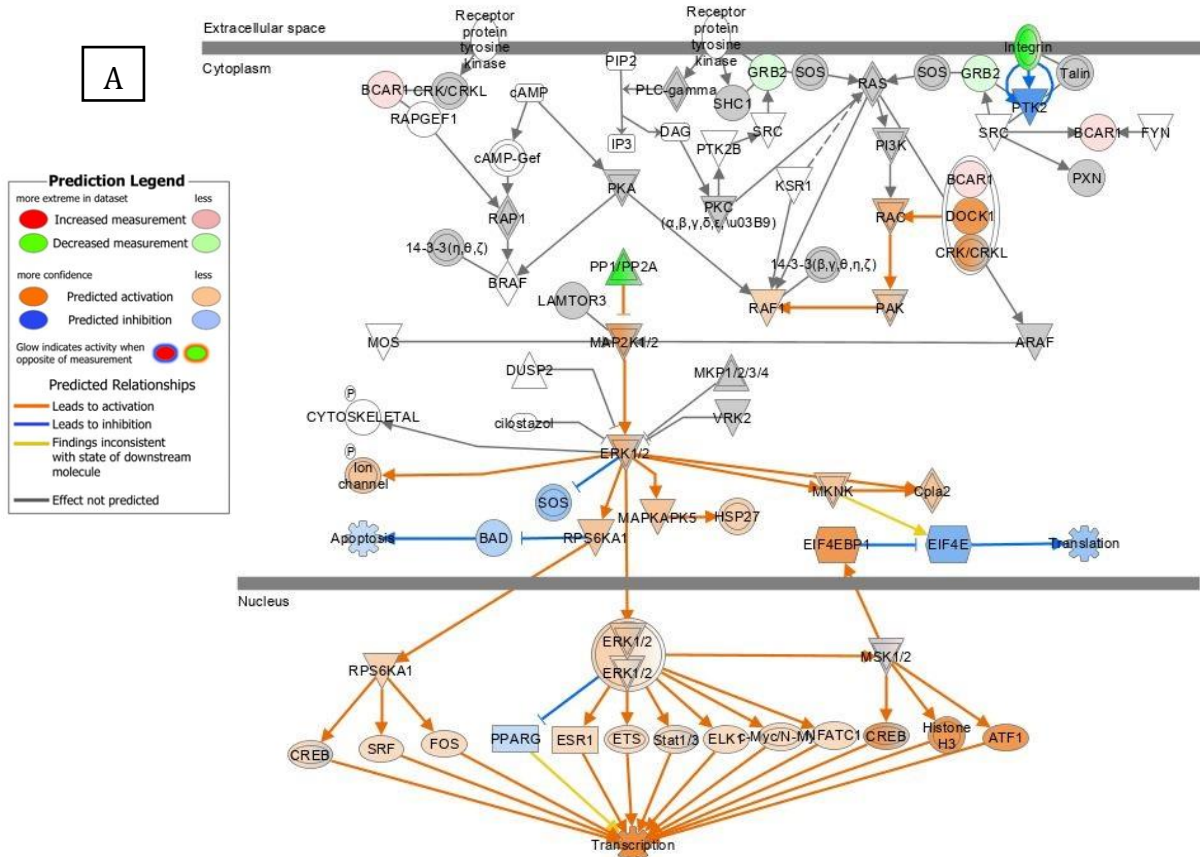


Figure 39- Effect of *in vivo* alcohol on ERK/MAPK canonical pathway. Analysis on proteome of Alcohol Villi ($n=5$) in comparison to Control villi ($n=5$) were made by 3P5 proteomic IC platform at cochin hospital. Analysis of relative expression/ fold change/ z-score and statistical analysis were made by Perseus® Maxquant®, Excel® and Ingenuity® softwares. (A): schematic representation of effect of *in vivo* alcohol on growth hormone's Ingenuity Canonical Pathways. All legends are described on link: https://qiagen.secure.force.com/KnowledgeBase/articles/Basic_Technical_Q_A/Legend. (B) Graphical representation of *in vivo* alcohol effect on 8 proteins implicated ERK/MAPK signaling pathway. Relative protein expressions of GRB2 (Growth factor receptor-bound protein 2), BCAR1 (Breast cancer anti-estrogen resistance protein 1), ITGA2 (Integrin alpha-2), ITGA3 (Integrin alpha-3), ITGA2B (Integrin alpha-IIb), ITGAM (Integrin alpha-M), PPP2R5E (Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit epsilon isoform), RPS6KA5 (Ribosomal protein S6 kinase alpha-5), are expressed in fold change normalized on control. Statistical analyses are made by Student test- P -value > 0.05; P -value < 0.05 (*); P -value \leq 0.01 and Fisher test ($-1.5 < FC < 1.5$)

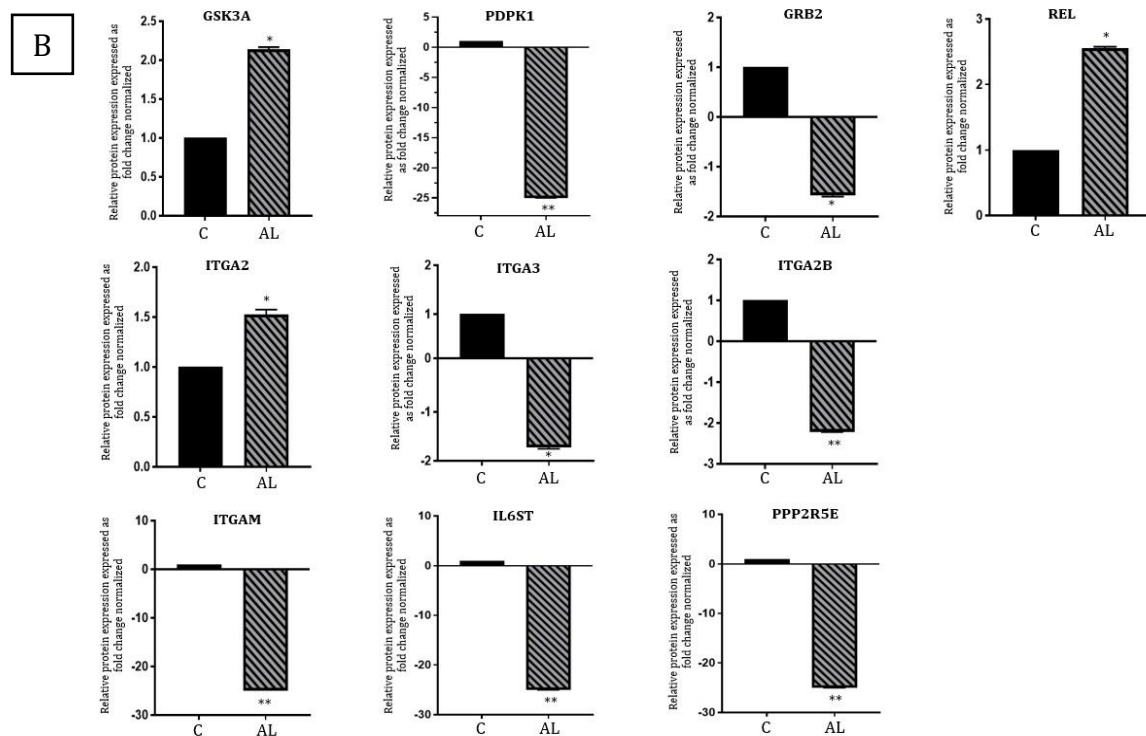
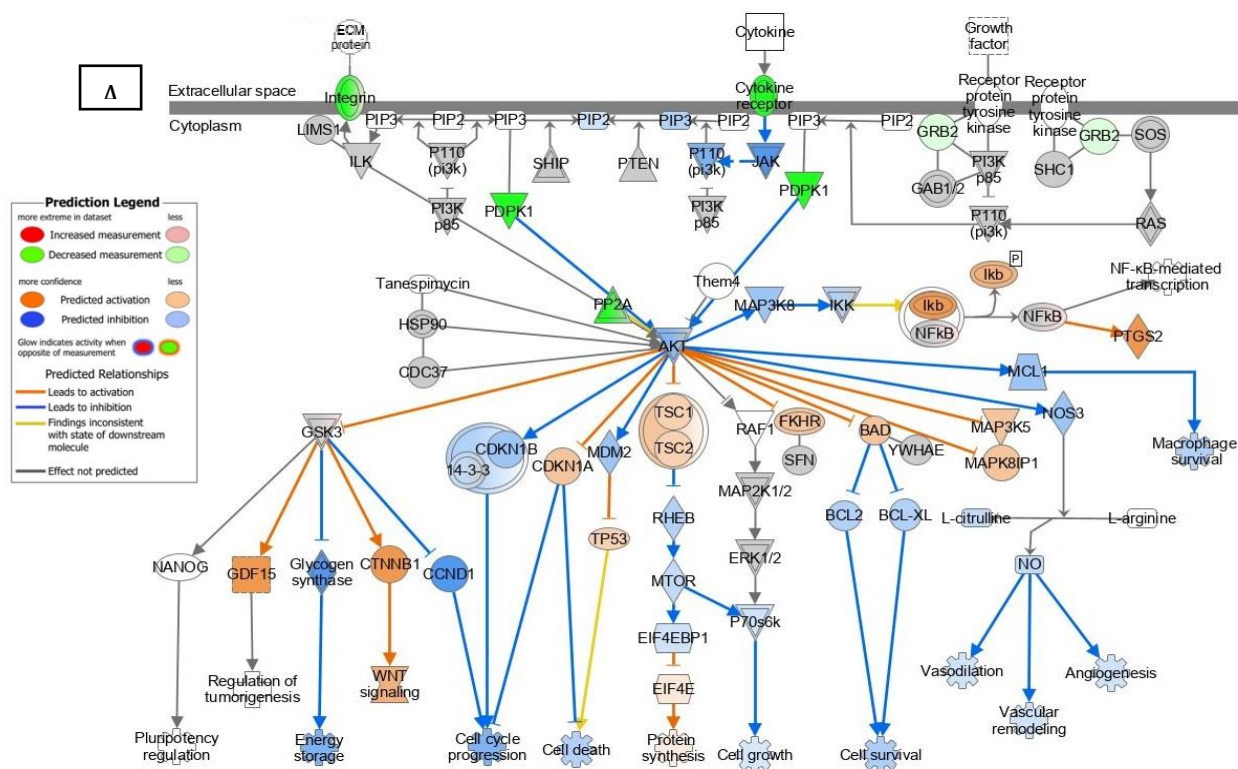
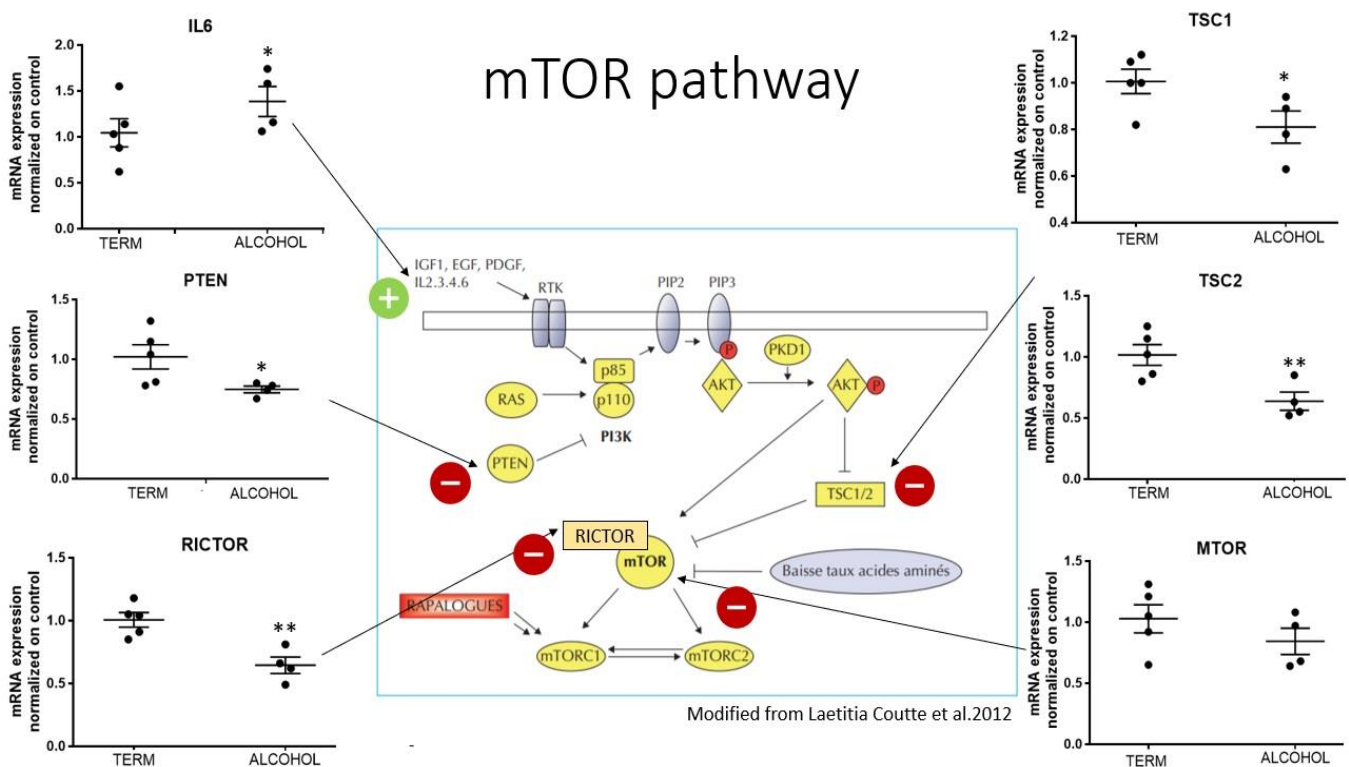


Figure 40- Effect of in vivo alcohol on PI3K/AKT canonical pathway. Analysis on proteome of Alcohol Villi (n=5) in comparison to Control villi (n=5) were made by 3P5 proteom'IC platform at cochin hospital. Analysis of relative expression/ fold change/ z-score and statistical analysis were made by Perseus® Maxquant®, Excel® and Ingenuity® software. (A): schematic representation of effect of in vivo alcohol on growth hormone's Ingenuity Canonical Pathways. All legends are described on link: https://qiagen.secure.force.com/KnowledgeBase/articles/Basic_Technical_Q_A/Legend. (B) Graphical representation of in vivo alcohol effect on 10 proteins implicated PI3K/AKT signaling pathway. Relative protein expressions of GSK3A (Glycogen synthase kinase-3 alpha), PDPK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1), GRB2(Growth factor receptor-bound protein 2), REL (Proto-oncogene c-Rel), ITGA2 (Integrin alpha-2), ITGA3 (Integrin alpha-3), ITGA2B (Integrin alpha-IIb), ITGAM (Integrin alpha-M), IL6ST (Interleukin-6 receptor subunit beta), PPP2R5E (Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit epsilon isoform), are expressed in fold change normalized on control. Statistical analyses are made by Student test- P-value > 0.05; P-value ≤ 0.05 (*); P-value ≤ 0.01 (**);

k) Impact de l'alcool sur la signalisation de la voie mTOR

Intimement liée à la voie de signalisation PI3K/AKT, la voie de signalisation mTOR permet de renforcer le métabolisme énergétique et joue également un rôle dans la régulation des facteurs pro et anti-apoptotique.

Deux techniques d'expérimentation ont permis d'analyser la voie de signalisation mTOR dans les deux groupes d'échantillons.



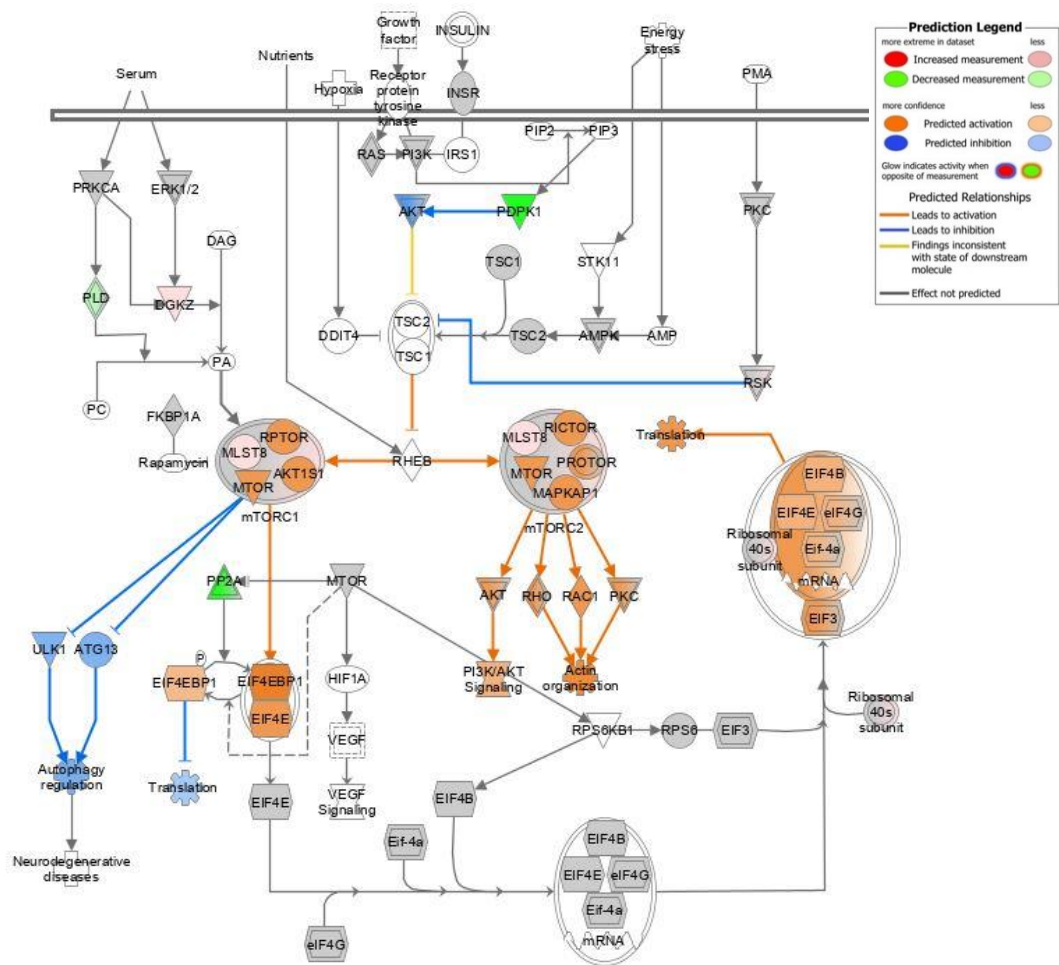
Premièrement, une analyse transcriptionnelle a été réalisée afin de déterminer les altérations par l'alcool au niveau génique (par qPCR) sur n=5 villosités issues de femmes « contrôles » et n=5 villosités issues de femmes ayant consommé de l'alcool au cours de leur grossesse. Les résultats ont été analysés par le logiciel Biorad™ CFX Maestro puis les statistiques ont été réalisées par Graphpad Prism™ et Excel™. Les expressions relatives de transcrits des gènes analysés sont donnés en Fold Change et le test statistique réalisé pour l'étude de la significativité est un t-test avec SD cohérente.

L'expression transcriptionnelle des acteurs de la voie de signalisation mTOR est significativement altérée par l'exposition à l'alcool *in vivo* (Figure 41). L'expression relative des ARN messagers de IL6 (interleukin-6) a été significativement augmentée dans les villosités « alcool » en comparaison avec des villosités « contrôles ». L'expression relative des ARN messagers de PTEN (Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase PTEN), de RICTOR (Rapamycin-insensitive companion of mTOR), de TSC1 (Hamartin) et de TSC2 (Tuberin) a été significativement diminuée dans les villosités « alcool » en comparaison avec des villosités « contrôles ». Enfin la variation d'expression relative des ARN messagers de mTOR n'est pas significative mais une tendance à la diminution est tout de même observée.

Deuxièmement, une analyse traductionnelle (protéome) a également été réalisée comme décrit précédemment sur n=5 villosités issues de femmes « contrôles » et n=5 villosités issues de femmes ayant consommé de l'alcool au cours de leur grossesse.

La voie de signalisation de mTOR est impactée par l'alcool (Figure 42 (A)). Huit protéines, dans cette voie, ont été altérées par l'alcool *in vivo*. L'expression protéique relative de PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1), PLD3 (5'-3' exonuclease PLD3) et PPP2R5E (Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit epsilon isoform) a été significativement diminuée dans les villosités exposées à l'alcool *in vivo* par rapport aux villosités issues des « contrôles » (Figure 42 (B)). L'expression protéique relative de RPS6KA5 (Ribosomal protein S6 kinase alpha-5), RPS16 (40S ribosomal protein S16), MLST8 (Target of rapamycin complex subunit LST8), DGKZ (Diacylglycerol kinase zeta) et EIF4EBP2 (Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 2) a été significativement augmentée dans les villosités « alcool » par rapport aux villosités « contrôles » (Figure 42 (B)). Malgré ces changements dans l'expression des protéines par l'exposition l'alcool *in vivo*, Ingenuity™ ne prédit pas d'activation ou d'inactivation de la voie de signalisation de mTOR par l'alcool (z-score = 0.447 (NS)), cependant il indique que la voie est significativement altérée (p-value= 6.23E-03).

A



B

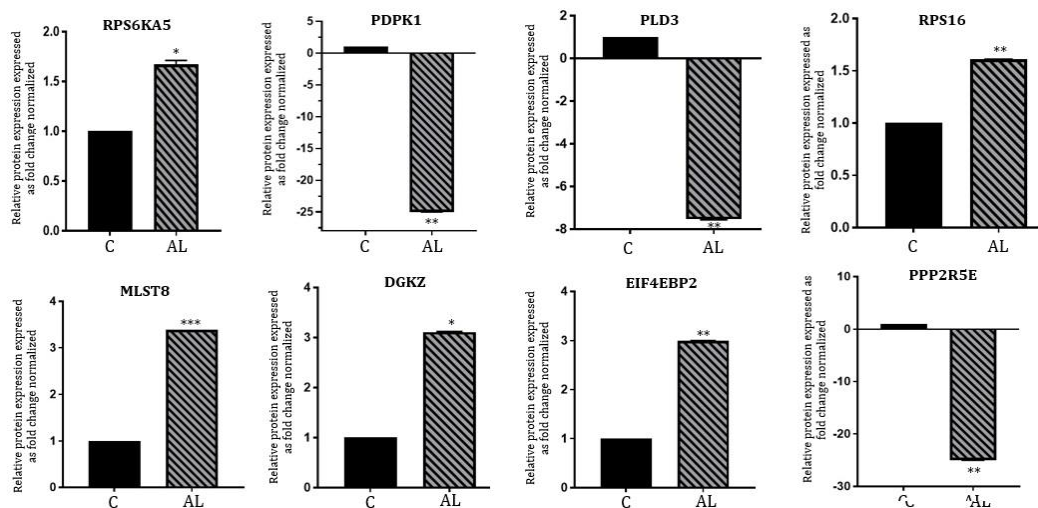


Figure 42- Effect of *in vivo* alcohol on mTOR canonical pathway. Analysis on proteome of Alcohol Villi ($n=5$) in comparison to Control villi ($n=5$) were made by 3P5 proteom^{IC} platform at cochin hospital. Analysis of relative expression/ fold change/ z-score and statistical analysis were made by Maxquant®, Excel® and Ingenuity® softwares. (A): schematic representation of effect of *in vivo* alcohol on mTOR's signaling Ingenuity Canonical Pathways. All legends are described on link: https://qiagen.secure.force.com/KnowledgeBase/articles/Basic_Technical_Q_A/Legend. (B) Graphical representation of *in vivo* alcohol effect on 8 proteins implicated ERK/MAPK signaling pathway. Relative protein expressions of RPS6KA5 (Ribosomal protein S6 kinase alpha-5), PDPK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1), PLD3 (5'-3' exonuclease PLD3), RPS16 (40S ribosomal protein S16), MLST8 (Target of rapamycin complex subunit LST8), DGKZ (Diacylglycerol kinase zeta), EIF4EBP2 (Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 2) and PPP2R5E (Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit epsilon isoform), are expressed in fold change normalized on control. Statistical analyses are made by Student test- P-value > 0.05; P-value ≤ 0.05 (*); P-value ≤ 0.01 (**); P-value ≤ 0.001 (***)

- En conclusion de cette première partie, nous avons montré pour la première fois que l'alcool impacte de manière significative différentes fonctions du placenta humain : la fonction endocrine, la fonction des transports et des échanges et la fonction du métabolisme placentaire. Nous pouvons ainsi définir le **Syndrome d'Alcoolisme Placentaire (SAP)** comme **un ensemble de dysfonctions placentaires programmées par l'alcool** et notamment : une diminution significative de la fusion des trophoblastes, une augmentation très significative de la sécrétion d'hCG, une altération significative protéique de 61 transporteurs (dont 22 transporteurs SLC essentiels au bon fonctionnement du placenta) et une altération significative de toutes les voies métaboliques placentaires, dont une diminution significative du métabolisme lipidique.

- Ces fonctions placentaires sont pourtant essentielles au développement du fœtus et notamment du cerveau.

- Ceci nous amène à introduire la seconde partie avec l'axe placenta/cerveau.

Partie 2 :

**Neuro-placentologie et
alcoolisation**

Récemment, plusieurs études, décrites dans l'introduction, ont permis de mettre en lumière et de nommer l'axe d'étude impliquant le rôle direct du placenta dans le développement cérébral fœtal. La neuroplacentologie prend tout son sens dans le cadre de l'étude AlcoBrain. Notamment le Dr Gonzalez et son équipe ont mis en évidence l'effet direct de molécules dérégulées dans le placenta de souris gestantes alcoolisées *in vivo*, sur le cerveau fœtal du souriceau. Ces molécules régulant l'angiogenèse placentaire seront présentées dans la partie 3 « caractérisation de biomarqueurs placentaires d'alcoolisation *in utero* ». Cependant la dérégulation corticale des cerveaux de souriceaux exposés à l'alcool *in vivo* nous a conduit à étudier les neurotransmetteurs. Le placenta sans être un organe innervé, est connu pour synthétiser, médier les effets d'un très grand nombre de neurotransmetteurs. De plus, il apparaît que l'altération de la signalisation de mTOR est liée à l'altération de l'expression des neurotransmetteurs et de leurs récepteurs. Cette dérégulation est impliquée dans de nombreuses pathologies (recoupant inexorablement les pathologies induites par les TCAF). Nous nous sommes donc posé la question de la présence des récepteurs aux neurotransmetteurs dans le placenta humain et l'impact qu'aurait l'alcool sur ces récepteurs. Puis de manière plus globale nous sommes intéressés à l'impact de l'alcool sur la voie des fonctions et pathologies de neurodéveloppement.

Ainsi cette partie sera divisée en trois sous parties :

- A. Cartographie placentaire évolutive au cours de la grossesse des récepteurs placentaires de neurotransmetteurs (Analyse transcriptionnelle)
- B. Impact de l'alcool *in vivo* sur l'expression de ces récepteurs (Analyse transcriptionnelle)
- C. Impacte de l'alcool *in vivo* sur les voies de signalisation protéique impliquées dans la fonction du développement cérébral (Analyse protéomique)

Les deux premiers axes s'appuieront sur les résultats rassemblés dans les tableaux 15-16-17-18 regroupant les neurorécepteurs exprimés par les villosités placentaires issus de placentas (placentas de premier trimestre issus d'IVG précoce, de placentas à terme « contrôle » et de placentas de femmes ayant consommé de l'alcool pendant la grossesse). Les récepteurs qui, dans l'analyse, n'ont été retrouvés dans aucun des trois groupes, n'ont pas été indiqués dans les Tableaux.

Les profils d'expression de transcrits des villosités placentaires des patientes à terme « contrôles » et « alcool » et de villosités du 1^{er} trimestre ont été évalués par qPCR sur plaques coatées Qiagen™ RT2 profiler (ID GeneGlobe- PAHS-060Z). Pour l'analyse, les villosités issues de n=5 placentas « contrôles » à terme, n=5 placentas « alcool » à terme et n=5 placentas issus du début du 1^{er} trimestre (EA = *Early Abortion*) ont été utilisés pour identifier d'une part les récepteurs des neurotransmetteurs humains dont l'expression transcriptionnelle est présente au niveau du placenta, et d'autre part leur altération par l'alcool *in vivo* le cas échéant. Les résultats obtenus ont été traités sur le logiciel BIORAD™ CFX Maestro afin d'extraire les données et de vérifier les cycles ; puis les FC ont été calculés, analysés statistiquement et mis en forme par les logiciels Excel™ et GraphPad Prism™. Enfin les fonctions et localisations de chacun des récepteurs de neurotransmetteurs retrouvés dans le placenta humain ont été décrites en matchant les banques de données de PUBMED avec celles d'UNIPROT. Chaque tableau est alors constitué ainsi : La famille de neurorécepteurs, les récepteurs étudiés et présents dans au moins un des trois groupes, les fonctions dans lesquelles sont impliqués les récepteurs et son/ses neurotransmetteur. s d'après les données de la littérature ainsi que sa localisation subcellulaire.

Par la suite, la différence d'expression transcriptionnelle d'un récepteur donné au début du 1^{er} trimestre de grossesse en comparaison avec l'expression de ce récepteur par les villosités « contrôles » (terme) a été indiquée afin d'obtenir la cartographie évolutive temporelle de ces récepteurs (seules les différences ayant un p-value significative ont été placées dans les tableaux). Enfin l'impact de l'alcool est indiqué en comparant le profil d'expression transcriptionnelle de placentas « alcool » en comparaison avec les placentas terme « contrôles » (seules les différences ayant une p-value significative ont été placées dans les tableaux). Les statistiques ont été calculées pour l'ensemble des résultats par un t-test avec SD cohérente <0.05.

Afin de faciliter la lecture de l'ensemble de ces tableaux, la légende a été introduite ci-dessous :

Table 15-16-17-18: Presence of neurotransmitters and their receptors in human placenta. These Tables group the 73 neurotransmitter-receptors whose the transcriptomic expression was found in the chorionic villus of full-term placenta, exposed or not to alcohol and placenta from the first trimester (early abortion (EA)). For each Table, it is indicated the family of neurotransmitters, the receptors of this family that have been found in the chorionic villi, their functions, and their subcellular localizations. The comparison between control term chorionic villi and the villi from early abortion made it possible to obtain an evolutionary mapping of these receptors within the placenta. Finally, the effect of alcohol was observed by comparing villi exposed to in vivo alcohol to term control villi. These results were obtained by qPCR with Qiagen

RT2 profiler plates. The statistics were performed with GraphPad prism 7.0. Relative mRNA expressions are expressed in fold change normalized on control. Statistical analyses are made by unpaired t-test with consistent SD- P-value > 0.05; P-value ≤ 0.05 (); P-value ≤ 0.01 (**); P-value ≤ 0.001 (***)*.

Table 15

Famille de Neuro-transmetteurs	Recepteurs étudiés	Fonctions	localisation subcellulaire	Cartographie évolutive		Impact de l'alcool	
				Différence d'expression au 1er trimestre par rapport au control terme	P value (FC)	Alteration avec l'alcool par rapport au control terme	P value (FC)
Hypocretin (orexin) receptors binding	HCRT2	Lie les neuropeptides qui jouent un rôle important dans la régulation de la prise alimentaire et le sommeil. Un rôle plus large dans la régulation homéostatique du métabolisme énergétique, de la fonction autonome, de l'équilibre hormonal et de la régulation des fluides corporels est également suggéré.	Synapses	↘	0,0005 ***	NS	NS
Histamine Receptors	HRH1	Médie la contraction des muscles lisses, l'augmentation de la perméabilité capillaire due à la contraction des veinules terminales et la libération de catécholamines par la médullosurrénale. Joue également un rôle la médiation de la neurotransmission dans le système nerveux central.	Dendrites et synapses	↘	0,0166 *	NS	NS
	HRH4	Médie les signaux de l'histamine dans les tissus périphériques. Présente un niveau significatif d'activité constitutive.	Dendrites et synapses	NS	NS	NS	NS
G-protein coupled receptor for 5-hydroxytryptamine (Serotonin receptors)	HTR1B	Récepteur couplé à la protéine G pour la (sérotonine. C'est également un récepteur pour les dérivés alcaloïdes, divers médicaments anxiolytiques et antidépresseurs et d'autres substances psychoactives, telles que le LSD. Régule la libération de la sérotonine, de dopamine et d'acétylcholine dans le cerveau. Affecte ainsi l'activité neuronale, le traitement nociceptif, la perception de la douleur, l'humeur et le comportement. En outre, joue un rôle dans la vasoconstriction des artères cérébrales.	Pré-synapses, calice de Held, dendrites	↘	0,0008 ***	NS	NS
	HTRD1	Même rôle que HTR1B. Régule la libération de la sérotonine dans le cerveau et affecte ainsi l'activité neuronale. Peut également jouer un rôle dans la régulation de la libération d'autres neurotransmetteurs. Peut jouer un rôle dans la vasoconstriction.	Dendrites et synapses	NS	NS	NS	NS
	HTRF1	Récepteurs de la sérotonine et récepteur pour divers alcaloïdes et substances psychoactives.	Dendrites et synapses	↘	0,0021 **	NS	NS
	HTR2A	Récepteurs de la sérotonine et récepteur pour divers alcaloïdes et substances psychoactives. Sa signalisation active la phospholipase C et un deuxième système messager phosphatidylinositol-calcium qui module l'activité de la phosphatidylinositol 3-kinase et favorise la libération d'ions Ca2+ à partir des réserves intracellulaires. Affecte l'activité neuronale, la perception, la cognition et l'humeur. Joue un rôle dans la régulation du comportement, y compris les réponses aux situations anxiogènes et aux substances psychoactives. Joue un rôle dans la vasoconstriction artérielle.	Pré-synapses, dendrites, axones	NS	NS	NS	NS
	HTR3A	Joue un rôle dans la régulation et la libération de sérotonine. Ce récepteur est un canal ionique dépendant du ligand qui, lorsqu'il est activé, provoque des réponses rapides et dépolarisantes dans les neurones. C'est un canal ionique spécifique aux cations, mais par ailleurs relativement non sélectif.	Synapses, post-synapses, projections neuronales	NS	NS	NS	NS
	HTR4	Joue un rôle dans la régulation et la libération de sérotonine.	Dendrites et synapses	↘	0,0484 *	inexistant	0,01 **
	HTR7	Joue un rôle dans la régulation et la libération de sérotonine.	Dendrites et synapses	NS	NS	NS	NS
Neuropeptides Y receptors	NPY2R	Prédit pour activer le régulateur des canaux calciques et l'activité des récepteurs Y des neuropeptides. Impliqué dans la morphogenèse du ventricule gauche cardiaque et la morphogenèse des voies d'écoulement. Impliqué dans la maladie de Huntington et l'obésité. Biomarqueur de la maladie artérielle périphérique et de l'épilepsie.	Cilium	NS	NS	NS	NS
	NPY5R	Associé à la prise alimentaire. Pourrait être impliqué dans des troubles de l'alimentation.	Projections neuronales et synapses	↘	0,0087 **	NS	NS
Neurotensine receptors	NTSR2	Récepteur de la neurotensine. La protéine codée par ce gène appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G qui activent un deuxième système messager phosphatidylinositol-calcium.	membrane plasmique	NS	NS	NS	NS
Oxytocin receptors	OXTR	Récepteur de l'ocytocine. L'activité de ce récepteur est médiée par des protéines G qui activent un deuxième système messager phosphatidylinositol-calcium.	Jonctions adhérentes et microvillosités	NS	NS	NS	NS
Prokineticin receptors	PROXR2	Récepteur de la prokinétine 2. Exclusivement couplé à la sous-classe G(q) des protéines G hétéromères. L'activation entraîne la mobilisation du calcium, la stimulation du renouvellement des phosphoinositides et l'activation de la protéine kinase activée par les mitogènes p44/p42.	membrane plasmique	NS	NS	NS	NS
Secretin receptors	SCTR	Récepteur de la sécrétine, qui est impliqué dans différents processus tels que la régulation du pH du contenu duodénal, la prise alimentaire et l'homéostasie de l'eau. En plus de réguler le pH du contenu duodénal, joue un rôle central dans la thermogenèse induite par l'alimentation: agit comme un activateur de la graisse brune non sympathique médiant la thermogenèse prandiale, ce qui induit par conséquent la satiété. Également capable de stimuler la lipolyse dans les adipocytes. Joue également un rôle dans le système nerveux central: nécessaire à la plasticité synaptique.	membrane plasmique	NS	NS	NS	NS
Somatostatin receptors	SSTR1	La somatostatine est une hormone peptidique qui régule diverses fonctions cellulaires telles que la neurotransmission, la prolifération cellulaire et la signalisation endocrinienne, tout en inhibant la libération de nombreuses hormones et autres protéines sécrétées.	Projections neuronales et cytoplasme	NS	NS	NS	NS
	SSTR2	Inhibe l'entrée du calcium. Agit en tant que récepteur fonctionnellement dominant de la somatostatine dans les cellules alpha et bêta pancréatiques où il médie l'effet inhibiteur de la somatostatine-14 sur la sécrétion d'hormones. Inhibe la croissance cellulaire par l'amélioration de la phosphorylation de MAPK1 et MAPK2 et la régulation à la hausse subséquente de CDKN1B. Stimule la migration neuronale et l'excroissance axonale et peut participer au développement et à la maturation des neurones pendant le développement du cerveau. Médie la régulation négative de la signalisation des récepteurs de l'insuline par PTPN6. Inactive la fonction du récepteur SSTR3 après hétérodimérisation	Projections neuronales et cytoplasme	NS	NS	NS	NS
	SSTR4	Médie l'action antiproliférative de la somatostatine dans les cellules tumorales.	Projections neuronales et cytoplasme	NS	NS	NS	NS
Tachykinin neuropeptide substance P receptors	TACR1	Récepteur de la neurokinine (tachykinine substance P). La neurokinine est impliquée dans la médiation du métabolisme du phosphatidylinositol de la substance P.	Dendrites et sperme	↘	0,0003 ***	↘	0,0016 **
	TACR2	Récepteur de la neurokinine A (tachykinine substance K). Les tachykinines excitent les neurones, évoquent des réponses comportementales, sont de puissants vasodilatateurs et contractent (directement ou indirectement) de nombreux muscles lisses (Par similitude).	sperme	↘	0,0275 *	↘	0,0246 *
	TACR3	Récepteur de la neurokinine B (Tachykinine 3- Neuremodin-K). Les tachykinines excitent les neurones, évoquent des réponses comportementales, sont de puissants vasodilatateurs et contractent (directement ou indirectement) de nombreux muscles lisses (Par similitude). Est un régulateur central essentiel de la fonction gonadique.	dendrites et sperme	NS	NS	NS	NS
protoporphyrin receptors	TSPO	Peut se lier à la protoporphyrine IX et peut jouer un rôle dans le transport des porphyrines et de l'hème (par similitude). Favorise le transport du cholestérol à travers les membranes mitochondriales et peut jouer un rôle dans le métabolisme des lipides.	mitochondrie	NS	NS	NS	NS

Table 16

Famille de récepteurs	Recepteurs étudiés	Fonctions	localisation subcellulaire	Cartographie évolutive		Impact de l'alcool	
				Différence d'expression au 1er trimestre par rapport aux contrôles terme	p value	Alteration avec l'alcool par rapport aux contrôles terme	p-value (FC)
Gastrin-releasing peptide receptors	GRPR	Récepteur du peptide libérant de la gastrine (GRP). Contribue à la régulation de l'apport alimentaire. Contribue à la perception de stimuli prurigineux et à la transmission de signaux de démangeaisons dans la moelle épinière qui favorisent le comportement de grattage, mais ne joue pas de rôle dans la perception de la douleur. Contribue à la mémoire de la peur à long terme, mais pas à la mémoire spatiale normale (par similitude).	membrane plasmique	NS	NS	NS	NS
	GRIA2	Récepteur du glutamate qui fonctionne comme un canal ionique dépendant du ligand dans le système nerveux central. Il joue un rôle important dans la transmission synaptique excitatrice. Le L-glutamate agit comme un neurotransmetteur excitateur au niveau de nombreuses synapses du système nerveux central. Fait partie du complexe AMPA-glutamate-receptor	Synapses, dendrites, neurones	NS	NS	NS	NS
Glutamate receptor	GRIA3	même fonctions que GRIA2	dendrites et cellules de Purkinje	↘	0,0186 *	↘	0,0065 **
	GRIK1	Le L-glutamate agit comme un neurotransmetteur excitateur au niveau de nombreuses synapses du système nerveux central. Peut être impliqué dans la transmission de l'information lumineuse de la rétine à l'hypothalamus.	post synapses	↘	0,0074 **	↘	0,0016 **
	GRIK2	Le L-glutamate agit comme un neurotransmetteur excitateur au niveau de nombreuses synapses du système nerveux central. Module l'expression de la surface cellulaire de NETO2 (par similitude). Indépendant de son activité de récepteur du glutamate ionotrope, agit comme un thermorécepteur conférant une sensibilité aux températures froides. Fonctions dans les neurones ganglionnaires de la racine dorsale (Par similitude).	Dendrites, synapses, hippocampe, péricaryons, post synapses, bouton terminal	↘	0,0011 **	NS	NS
	GRIK4	Le L-glutamate agit comme un neurotransmetteur excitateur au niveau de nombreuses synapses du système nerveux central.	pré et post synapses, hippocampe	↘	0,0016 **	NS	NS
	GRIK5	Le L-glutamate agit comme un neurotransmetteur excitateur au niveau de nombreuses synapses du système nerveux central.	Dendrites, synapses, hippocampe péricaryons, bouton terminal	NS	NS	NS	NS
	GRIN1	Composant de complexes récepteurs NMDA qui fonctionnent comme des canaux ioniques hétérotétramères dépendants du ligand avec une perméabilité élevée au calcium et une sensibilité dépendante de la tension au magnésium. L'activation du canal nécessite la liaison du neurotransmetteur glutamate à la sous-unité epsilon, la liaison de la glycine à la sous-unité zêta, ainsi qu'une dépolarisation membranaire pour éliminer l'inhibition du canal par Mg ²⁺ .	Dendrites, synapses, projections neuronales, post synapses et vésicules synaptiques, bouton terminal	NS	NS	NS	NS
	GRIN2B	Composant des complexes récepteurs NMDA. De concert avec DAPK1 aux sites extra synaptiques, agit comme un médiateur central pour les dommages causés par l'AVC. Contribue à la formation de schémas neuronaux dans le cerveau en développement. Joue un rôle dans la dépression à long terme (LTD) des courants membranaires de l'hippocampe et dans la plasticité synaptique (Par similitude).	synapses, post synapses, projections neuronales, lysosome, endosome	NS	NS	NS	NS
	GRIN2C	Composant des complexes récepteurs NMDA. Joue un rôle dans la régulation de l'équilibre entre l'activité excitatrice et inhibitrice des neurones pyramidaux dans le cortex préfrontal. Contribue à la phase lente du courant postsynaptique excitateur, à la potentialisation synaptique à long terme et à l'apprentissage (par similitude)	synapses, post synapses	↘	0,0027 **	NS	NS
	GRM3	Le L-glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur du système nerveux central et active à la fois les récepteurs ionotropes et métabotropes du glutamate. La neurotransmission glutamatergique est impliquée dans la plupart des aspects du fonctionnement normal du cerveau et peut être perturbée dans de nombreuses affections neuropathologiques.	Astrocytes, axones, dendrites, synapses, post synapses	NS	NS	NS	NS
	GRM4	même fonctions que GRM3	pré synapses	NS	NS	NS	NS
	GRM5	même fonctions que GRM3. Joue un rôle important dans la régulation de la plasticité synaptique et la modulation de l'activité du réseau neuronal.	Astrocytes, axones, dendrites, synapses, post synapses, cellules de Schaeffer	NS	NS	NS	NS
	GRM6	même fonctions que GRM3. La signalisation stimule l'activité du canal TRPM1 et l'absorption de Ca ²⁺ . Requis pour une vision normale.	dendrites, synapses	↘	0,0245 *	NS	NS
	GRM7	même fonctions que GRM3	pré synapses, synapses, axones, dendrites	NS	NS	NS	NS

Table 17

Famille de récepteurs	Récepteurs étudiés	Fonctions	localisation subcellulaire	Cartographie évolutive		Impact de l'alcool	
				Différence d'expression au 1er trimestre par rapport aux contrôles terme	p value	Altération avec l'alcool par rapport aux contrôles terme	p-value (FC)
Adrenergic receptors	ADRA1D	Ce récepteur alpha-adrénergique médie son effet par l'afflux de calcium extracellulaire. Régulation positive de la cascade MAPK	membrane plasmique	NS	NS	NS	NS
	ADRA2A	Les récepteurs alpha-2-adrénergiques sont des membres de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G. Ils sont impliqués dans la régulation de la libération de molécules de neurotransmetteurs à partir des nerfs sympathiques et des neurones adrénergiques du système nerveux central. Le système nerveux sympathique régule la fonction cardiovasculaire en activant les récepteurs adrénergiques du cœur, des vaisseaux sanguins et des reins. Les récepteurs alpha-2-adrénergiques sont également impliqués dans la signalisation des catécholamines par les voies extracellulaires des protéines kinases régulées 1 et 2 (ERK1/2).	Axones, synapses, neurones	↘	0,0034 **	↘	0,0115 *
	ADRA2B	Même fonctions que ADRA2A.	membrane plasmique	↘	0,0010 ***	NS	NS
	ADRB3	Les récepteurs bêta-adrénergiques médient l'activation induite par la catécholamine de l'adénylate cyclase par l'action des protéines G. La bêta-3 est impliquée dans la régulation de la lipolyse et de la thermogenèse	membrane plasmique	NS	NS	↘	0,0101 *
Gamma-aminobutyric acid	GABBR1	Composant d'un récepteur hétérodimérique couplé à la protéine G pour le GABA, formé par GABBR1 et GABBR2. Le calcium est nécessaire pour une liaison de haute affinité au GABA (par similitude). Joue un rôle essentiel dans le réglage fin de la transmission synaptique inhibitrice. Le récepteur GABA pré-synaptique inhibe la libération de neurotransmetteurs en régulant à la baisse les canaux calciques activés à haute tension, tandis que le récepteur GABA postsynaptique diminue l'excitabilité neuronale. Non seulement impliqué dans l'inhibition synaptique, mais également dans la potentialisation à long terme de l'hippocampe, le sommeil, la relaxation musculaire et l'anti nociception.	dendrites, pré et post synapses, synapses, vésicules synaptiques neurone, cellules de Schaeffer	NS	NS	NS	NS
	GABBR2	Même fonctions que GABBR1	post synapses, projections neuronales	NS	NS	NS	NS
	GABRA1	Canal chlorure dépendant du ligand qui est un composant du récepteur hétéropentamérique du GABA, le principal neurotransmetteur inhibiteur du cerveau. Joue un rôle important dans la formation de synapses GABAergiques inhibitrices fonctionnelles. Le récepteur alpha1 / beta2 / gamma2 présentent une activité synaptogène. La plasticité médiée par GABRA1 dans le cortex orbitofrontal régule la sélection d'action dépendante du contexte (par similarité). Fonctionne également comme récepteur de l'histamine et médie les réponses cellulaires à l'histamine (par similitude).	synapses, post synapses et projection neuronales	NS	NS	NS	NS
	GABRA2	même fonctions que GABRA1	synapses, post synapses, axones et projection neuronales	NS	NS	NS	NS
	GABRA4	Canal chlorure dépendant du ligand qui est un composant du récepteur hétéropentamérique du GABA, le principal neurotransmetteur inhibiteur du cerveau. Joue un rôle important dans la formation de synapses GABAergiques inhibitrices fonctionnelles.	synapses, post synapses et projection neuronales	↘	0,0015 **	NS	NS
	GABRB1	Composant du récepteur hétéropentamérique du GABA, le principal neurotransmetteur inhibiteur du cerveau des vertébrés. Fonctionne également comme récepteur de l'histamine et médie les réponses cellulaires à l'histamine. Fonctionne comme récepteur pour les diazépines et divers anesthésiques. Fonctionne comme un canal chlorure dépendant du ligand.	Synapses, dendrites, projections neuronales	↘	0,0043 **	↘	0,0213 *
	GABRB3	même fonctions que GABRA1 Joue un rôle important dans la somatosensation et dans la production d'anti nociception (par similarité).	synapses, projections neuronales	NS	NS	↘	0,0369 *
	GABRD	même fonctions que GABRA4	Synapses, dendrites, projections neuronales, axones	NS	NS	NS	NS
	GABRE	même fonctions que GABRA4	Synapses, post synapses, dendrites, projections neuronales	↘	0,0007 ***	NS	NS
	GABRG2	même fonctions que GABRA1	Synapses, post synapses, dendrites, projections neuronales, axones	NS	NS	NS	NS
	GABRG3	même fonctions que GABRA4	Synapses, post synapses, dendrites, projections neuronales	NS	NS	inexistant	0,001 **
	GABRQ	même fonctions que GABRA4	synapses, post synapses, projections neuronales	NS	NS	NS	NS
	GABRR1	même fonction que GABRA4. Le récepteur GABA Rho-1 pourrait jouer un rôle dans la neurotransmission rétinienne	synapses, post synapses, projections neuronales	NS	NS	NS	NS
	GABRR2	même fonction que GABRA4. Le récepteur GABA Rho-2 pourrait jouer un rôle dans la neurotransmission rétinienne	synapses, post synapses, projections neuronales	↘	0,0006 ***	↘	0,0070 **

Table 18

Famille de récepteurs	Récepteurs étudiés	Fonctions	localisation subcellulaire	Cartographie évolutive		Impact de l'alcool	
				Différence d'expression au 1er trimestre par rapport aux contrôles terme	p value	Altération avec l'alcool par rapport aux contrôles terme	P value (FC)
Vasopressin receptors	AVPR1A	Récepteur de la vasopressine d'arginine. L'activité de ce récepteur est médiée par des protéines G qui activent un deuxième système messenger phosphatidylinositol-calcium. A été impliqué dans des comportements sociaux, y compris l'affiliation et l'attachement.	endosome	NS	NS	NS	NS
	AVPR1B	même fonctions que AVPR1A	axones, dendrites, péricaryons, endosome	NS	NS	NS	NS
Bombesin receptors	BRS3	Rôle dans la division, la maturation ou la fonction des spermatozoïdes. Ce récepteur médie son action par association avec des protéines G qui activent un deuxième système messenger phosphatidylinositol-calcium	neurones et projections neuronales	NS	NS	↘	0,0334 *
Gastrin/cholecystokinin receptors	CCKBR	Récepteur de la gastrine et de la cholécystokinine. Les récepteurs CCK-B sont présents dans tout le système nerveux central où ils modulent l'anxiété, l'analgésie, l'excitation et l'activité neuroleptique. Ce récepteur médie son action par association avec des protéines G qui activent un deuxième système messenger phosphatidylinositol-calcium.	membrane plasmique	↗	0,0114 *	NS	NS
Muscarinic acetylcholine receptors	CHRM1	Le récepteur muscarinique de l'acétylcholine intervient dans diverses réponses cellulaires, notamment l'inhibition de l'adénylate cyclase, la dégradation des phosphoinositides et la modulation des canaux potassiques.	axones, pré et post synapses, synapses, dendrites, cellules de Schaeffer	↘	0,0204 *	↘	0,0454 *
	CHRM4	même fonctions que CHRM1	dendrites, synapses, post synapses	↘	0,0315 *	NS	NS
	CHRM5	même fonctions que CHRM1	dendrites, synapses, post synapses	NS	NS	NS	NS
Neuronal acetylcholine receptors	CHRNA3	Impliqué dans la voie de signalisation médiée par l'acétylcholine	dendrites, synapses, post synapses, projections neuronales	NS	NS	NS	NS
	CHRNA4	même fonctions que CHRNA3	dendrites, synapses, post synapses, projections neuronales	NS	NS	NS	NS
	CHRNA5	même fonctions que CHRNA3	synapses, projections neuronales	NS	NS	NS	NS
	CHRNA6	même fonctions que CHRNA3	synapses, projections neuronales	NS	NS	NS	NS
	CHRNA7	même fonctions que CHRNA3	dendrites, synapses, post synapses, projections neuronales	NS	NS	NS	NS
	CHRNE	même fonctions que CHRNA3	synapses, projections neuronales, jonction neuro-musculaire	↗	0,0018 **	NS	NS
GTP-binding nuclear protein receptors	CNR1	Protéine de liaison au GTP impliquée dans le transport nucléocytoplasmique. Requis pour l'importation de protéines dans le noyau et également pour l'exportation d'ARN. Essentiel pour la viabilité cellulaire.	nucléaire	↘	0,0120 *	NS	NS
Dopamine receptor	DRD1	Impliqué dans la voie de signalisation de la dopamine	pré et post synapses, dendrites, Cilium	↘	0,0412 *	NS	NS
	DRD2	même fonction que DRD1. Régule positivement la régression postnatale des vaisseaux hyaloïdes rétinien via la suppression de l'activité VEGFR2/KDR, en aval de l'OPN5,	axones, Cilium, dendrites, péricaryons, synapses, post synapse, sperme (flagelle)	NS	NS	NS	NS
	DRD5	même fonction que DRD1	cilium, synapses	NS	NS	NS	NS

A. Cartographie placentaire évolutive au cours de la grossesse des récepteurs placentaires de neurotransmetteurs : (Tableaux 15-16-17-18)

L'expression transcriptionnelle de 73 récepteurs de neurotransmetteurs a été retrouvée dans au moins un des trois groupes de placentas : HCRT2, HRH1, HRH4, HTRB, HTR1F, HTR2A, HTR3A, HTR4, HTR7, NPY2R, NPY5R, NTSR2, OXTR, PROXR2, SCTR, SSTR1, SSTR2, SSTR4, TACR1, TACR3, TSPO, GRPR, GRIA2, GRIA3, GRIK1, GRIK2, GRIK4, GRIK5, GRIN1, GRIB2B, GRIN2C, GRM3, GRM4, GRM5, GRM6, GRM7, ADRA2A, ADRA2B, ADRB3, GABBR1, GABBR2, GABRA1, GRABRA2, GABRA4, GABRB1, GABRB3, GABRD, GABRE, GABRG2, GABRG3, GABRQ, GABRR1, GABRR2, AVPR1A, AVPR1B, BRS3, CCKBR, CHRM1, CHRM4, CHRM5, CHRNA3, CHRNA4, CHRNA5, CHRNA6, CHRNA7, CHRNE, CNR1, DRD1, DRD2, DRD5

Tous ces récepteurs sont présents dans le tissu trophoblastique à terme et le tissu trophoblastiques du début de 1^{er} trimestre mais le niveau d'expression transcriptionnelle diffère pour 23 d'entre eux. Seule l'expression des transcrits de CHRNE et CCKBR est significativement plus importante au 1^{er} trimestre de grossesse qu'au terme (p-value= 0.0114 et 0.0018 respectivement). Les transcrits de HCRT2 (p-value= 0.0005), HRH1 (p-value= 0.0166), HTR1B (p-value= 0.0008), HTRF1 (p-value= 0.0021), NPY5R (p-value= 0.0087), TACR1 (p-value= 0.0003), TACR2 (p-value= 0.0275), GRIA3 (p-value= 0.0186), GRIK1 (p-value= 0.0074), GRIK2 (p-value= 0.0011), GRIK4 (p-value= 0.0016), GRIN2C (p-value= 0.0027), GRM6 (p-value=0.0245), ADRA2A (p-value=0.0034), ADRA2B (p-value= 0.0010), GABRA4, (p-value= 0.0015), GABRB1 (p-value=0.0043), GABRE (p-value= 0.0007), GABRR2 (p-value=0.0006), CHRM1 (p-value= 0.0204), CHRM4 (p-value= 0.0315), CNR1 (p-value= 0.0120) et DRD1 (p-value=0.0412), sont significativement moins exprimés en début de 1^{er} trimestre qu'au terme de la grossesse.

Ces résultats nous permettent de caractériser pour la première fois une cartographie assez complète avec la présence des récepteurs neuronaux dans le placenta et d'obtenir, *via* les prélèvements de début et de fin de grossesse, l'évolution dans le temps de leur expression. De plus, le fait qu'une grande partie de ces neurotransmetteurs exprimés dans le placenta soit impliquée dans le développement du cerveau et que certains d'entre eux soient surexprimés au terme de la grossesse (création du réseau cortical fœtal), cela

suggère à quel point il est important d'étudier l'impact de l'alcool sur ces récepteurs placentaires de neurotransmetteurs.

B. Impact de l'alcool *in vivo* sur l'expression de ces récepteurs (Analyse transcriptionnelle)

L'analyse transcriptionnelle de n=5 villosités issues de patientes ayant consommé de l'alcool au cours de leur grossesse et n= 5 villosités issues du premier trimestre de grossesse en comparaison avec des villosités issues de patientes « contrôles » à terme

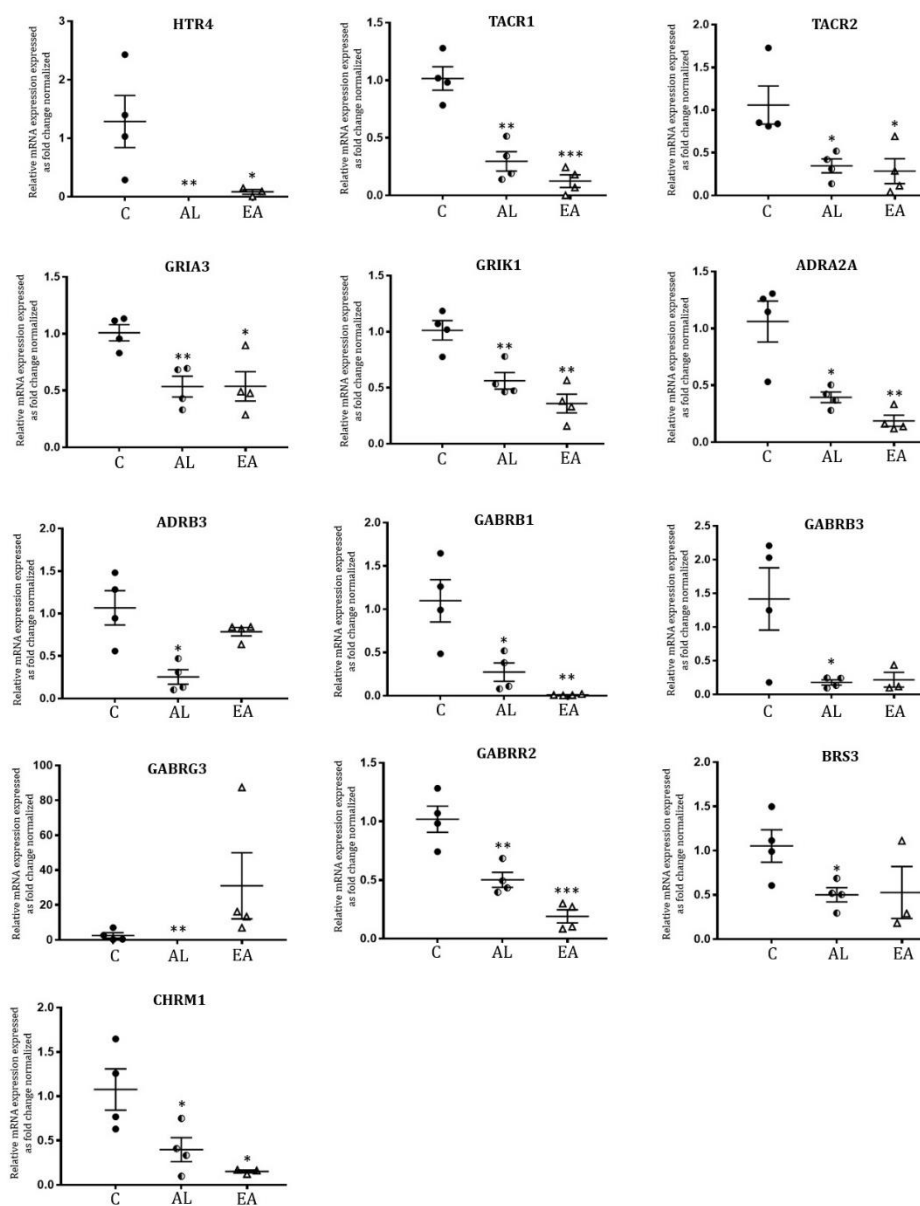


Figure 43 Impact of alcohol on neurotransmitter and their receptors. Graphical representation of *in vivo* effect of alcohol on 13 receptors of neurotransmitters. Alcohol exposed villi were compared with term control villi, but the mRNA expression of EA villi are indicated too (n=5 placentas/condition); The details of these receptors are indicated in Table 15-16-17-18. These results were obtained by qPCR with Qiagen RT2 profiler plates. The statistics were performed with GraphPad prism 7.0. Relative mRNA expressions are expressed in fold change normalized on control. Statistical analyses are made by unpaired t-test with consistent SD- P-value > 0.05; P-value ≤ 0.05 (*); P-value ≤ 0.01 (**); P-value ≤ 0.001 (***).

(chacun des groupes « alcool » et « IVG précoce » (EA) est comparé avec les « contrôles » termes) nous a permis d'étudier l'effet de l'alcool sur les récepteurs placentaires de neurotransmetteurs.

Les deux dernières colonnes des tableaux 15 à 18 présentent les 13 neurorécepteurs altérés par l'alcool avec indication la p-value. Pour plus de clarté, les Fold Change des 13 transcrits ont été graphiquement analysés (Figure 43).

L'expression transcriptionnelle des neurorécepteurs HTR4, TACR1, TACR2, GRIA3, GRIK1, ADRA2A, ADRB3, GABRB1, GABRB3, GABRG3, GABRR2, BRS3, CHRM1 est significativement diminuée par l'exposition à l'alcool *in vivo*. Autre fait intéressant, huit des 13 des récepteurs altérés par l'alcool *in vivo* sont des récepteurs dont l'expression est plus faible au 1^{er} trimestre comparativement au terme et il n'y a pas de différences significatives observées entre le groupe des villosités « alcool » et le groupe des villosité « 1^{er} trimestre ». De manière intéressante les récepteurs HTR4 et GABRG3 ne sont plus exprimés par les villosités de placentas « alcool ». Pour les neurorécepteurs ADRB3, GABRB3 et BRS3, leur niveau d'expression est diminué avec une exposition à l'alcool *in vivo* alors que le niveau d'expression dans le tissu trophoblastique ne change pas de façon significative au cours de la grossesse (comparaison « IVG précoces » et « termes »).

- ➔ Ces résultats ont permis de découvrir la présence de neurorécepteurs placentaires de neurotransmetteurs et de déterminer les stades de grossesse pendant lesquels ils sont le plus exprimés.
- ➔ L'alcool *in vivo* modifie certains de ces neurorécepteurs essentiels au bon développement du cerveau et de manière surprenante les taux d'expression de la majorité de neurorécepteurs impactés par l'alcool sont similaires aux niveaux d'expression retrouvés dans des placentas de premier trimestre.
- ➔ Ces résultats, particulièrement intéressants, nous ont induit à nous poser la question de l'impact de l'alcool sur les protéines impliquées dans le développement du cerveau foetal.

C. Impact de l'alcoolisation *in vivo* sur les voies de signalisation protéique impliquées dans la fonction du développement cérébral

L'étude de la banque de données « *diseases and functions* » du logiciel Ingenuity™ nous a permis de croiser les résultats en protéines différentielles obtenues lors de nos analyses avec celles impliquées dans le développement et la fonction du système nerveux. Cette étude nous permet d'observer l'impact de l'alcool sur 34 fonctions de développement du système nerveux humain (Tableau 19). Chacune de ces fonctions/pathologies est impactée significativement par l'alcool *in vivo* (p-value < 0.05) ; cependant seulement 6 de ces fonctions possèdent un z-score calculable (c'est-à-dire que l'ensemble des altérations protéiques de la voie par l'alcool sont cohérentes avec une activation ou une inactivation de la totalité de la fonction). Le z-score de ces fonctions n'étant néanmoins pas supérieur à 2 ou inférieur à -2, l'activation ou l'inactivation de ces voies n'est pas significativement prédite. Au total les expressions protéiques de 49 protéines communes au développement et au fonctionnement du système nerveux sont altérées par l'alcool *in vivo*.

Table 19 Effect of *in vivo* alcohol on Nervous system Development and function. Analysis on proteome of Alcohol Villi (n=5) in comparison to Control villi (n=5) were made by 3P5 proteom'IC platform at cochin hospital. Analysis of relative expression/ fold change/ z-score and statistical analysis were made by Perseus®, Maxquant®, Excel® and Ingenuity® software. 49 molecular of Nervous system Development and function were significantly affected by *in vivo* alcohol (p-value < 0.05. Fisher test);

Name			p-value range			
Nervous System Development and Function			2,23E-03 - 1,17E-06			
Categories	Diseases or Functions Annotation	p-value	Predicted Activation State	Activation z-score	Molecules	# Molecules
Cell-To-Cell Signaling and Interaction/Ner...	Long term synaptic depression of hippocam	1,17E-06		-0,248	↑EIF4EBP2, ↑FMR1, ↑GSK3A, ↑H...	7
Cell-To-Cell Signaling and Interaction/Ner...	Long term synaptic depression	2,12E-04		0,086	↑DGKZ, ↑EIF4EBP2, ↑FMR1, ↑G...	8
Cell-To-Cell Signaling and Interaction/Ner...	Long term synaptic depression of neurons	1,52E-04		0,421	↑DGKZ, ↑FMR1, ↑GSK3A, ↑HTT, ↑...	7
Cell-To-Cell Signaling and Interaction/Ner...	Long term synaptic depression of hippocam	2,40E-04		0,762	↑EIF4EBP2, ↑GSK3A, ↑RAB11FIP5,	4
Cell-To-Cell Signaling and Interaction/Ner...	Long term synaptic depression of hippocam	5,10E-06		1,067	↑FMR1, ↑GSK3A, ↑HTT, ↑RAB11...	5
Cell-To-Cell Signaling and Interaction/Ner...	Long term synaptic depression of brain cell:	3,00E-06		1,452	↑DGKZ, ↑FMR1, ↑GSK3A, ↑HTT, ↑...	6
Nervous System Development and Functio...	Morphology of brain	2,76E-06			↑AKTIP, ↑ARID1A, ↑CPEB4, ↑C...	24
Nervous System Development and Functio...	Morphology of central nervous system	4,54E-06			↑AKTIP, ↑ARID1A, ↑CASP4, ↑C...	25
Nervous System Development and Functio...	Abnormal morphology of brain	9,80E-06			↑ARID1A, ↑CTNNA2, ↑CTSB, ↑...	20
Nervous System Development and Functio...	Abnormal morphology of central nervous sy	1,37E-05			↑ARID1A, ↑CASP4, ↑CTNNA2, ↑...	21
Nervous System Development and Functio...	Morphology of cerebral cortex	2,83E-05			↑AKTIP, ↑CPEB4, ↑CTNNA2, ↑...	13
Nervous System Development and Functio...	Abnormal morphology of cerebrum	5,02E-05			↑CTNNA2, ↑CTSB, ↑EHMT1, ↑E...	11
Cell-To-Cell Signaling and Interaction/Ner...	Long term synaptic depression of hippocam	5,19E-05			↑FMR1, ↑HTT, ↑RAB11FIP5	3
Nervous System Development and Functio...	Morphology of nervous system	8,37E-05			↑AKTIP, ↑ARID1A, ↑BAIAP2, ↑...	33
Nervous System Development and Functio...	Abnormal morphology of cerebral cortex	1,91E-04			↑CTNNA2, ↑CTSB, ↑EHMT1, ↑E...	10
Nervous System Development and Functio...	Abnormal morphology of nervous system	2,99E-04			↑ARID1A, ↑CASP4, ↑CD44, ↑C...	27
Nervous System Development and Functio...	Abnormal morphology of globus pallidus	5,79E-04			↑HTT, ↑MAN2B1	2
Cell-To-Cell Signaling and Interaction/Cell...	Function of synapse	5,90E-04			↓CDH11, ↑FMR1, ↑HTT	3
Cell Morphology/Nervous System Develop...	Morphology of neurites	6,37E-04			↓CPEB4, ↑CTNNA2, ↑CTSB, ↑E...	13
Cell-To-Cell Signaling and Interaction/Ner...	Miniature excitatory postsynaptic currents	7,02E-04			↓CD44, ↑EHMT1, ↑EIF4EBP2, ↑F...	5
Embryonic Development/Nervous System ...	Formation of eye	1,21E-03			↑AKTIP, ↓B3GLCT, ↑CDK2, ↑CR...	16
Cell Morphology/Cellular Assembly and Or...	Morphology of dendritic spines	1,33E-03			↓CPEB4, ↑CTNNA2, ↑EHMT1, ↑...	6
Embryonic Development/Nervous System ...	Morphogenesis of brain	1,35E-03			↑AKTIP, ↓C12orf57, ↑CTNNA2, ↑...	5
Nervous System Development and Functio...	Establishment of blood-brain barrier	1,43E-03			↓CLDN1, ↓GSTM3	2
Cell-To-Cell Signaling and Interaction/Cell...	Paired-pulse facilitation of neurons	1,43E-03			↑FMR1, ↑HTT	2
Nervous System Development and Functio...	Abnormal morphology of rhombencephalon	1,47E-03			↑CTNNA2, ↑CTSB, ↑EPB41L1*, ↑...	8
Embryonic Development/Nervous System ...	Abnormal morphology of eye	1,56E-03			↓B3GLCT, ↑CDK2, ↑FMR1, ↑G...	11
Cell Morphology/Nervous System Develop...	Abnormal morphology of pyramidal neuron:	1,63E-03			↑EHMT1, ↑EIF4EBP2, ↑FMR1, ↑...	4
Cell Morphology/Cell-To-Cell Signaling an...	Plasticity of synapse	1,63E-03			↑BAIAP2, ↓CDH11, ↑EHMT1, ↑E...	7
Cell Morphology/Cellular Assembly and Or...	Length of dendritic spines	1,67E-03			↑EIF4EBP2, ↑FMR1, ↑HTT	3
Nervous System Development and Functio...	Morphology of hippocampus	1,86E-03			↓CPEB4, ↑CTNNA2, ↑CTSB, ↑EIF...	7
Nervous System Development and Functio...	Quantity of neocortical neurons	1,99E-03			↑NFI, ↑PPP4R3A	2
Embryonic Development/Nervous System ...	Morphology of eye	2,07E-03			↑AKTIP, ↓B3GLCT, ↑CDK2, ↑F...	12
Nervous System Development and Functio...	Abnormal morphology of hippocampus	2,23E-03			↑CTNNA2, ↑CTSB, ↑EIF4EBP2, ↑...	6

De la même manière, l'analyse protéomique nous a permis de croiser les résultats en protéines différentielles altérées par l'alcool *in vivo* avec celles impliquées dans les lésions cérébrales (Tableau 20). Cette fonction est très significativement altérée par l'alcool (p-value= 2.49×10^{-9}) mais le z-score n'est pas significatif du fait du croisement des 149 altérations (z-score = 0.606). Sur 149 protéines exprimées et altérées par l'alcool *in vivo* dans le trophoblaste, 97 sont up-régulées dans les voies de signalisation conduisant à une lésion cérébrale (Tableau 20).

Table 20 Effect of alcohol of brain lesion. Analysis on proteome of Alcohol Villi (n=5) in comparison to Control villi (n=5) were made by 3P5 proteom'IC platform at cochin hospital. Analysis of relative expression/ fold change/ z-score and statistical analysis were made by Maxquant®, Excel® and Ingenuity® software. Analyse of the impact of alcohol on Endocrine System Disorders.149 molecules implicated in brain lesion were significantly affected by in vivo alcohol, 97 were up-regulated (p-value<0.05. Student test)

Brain lesion (z-score 0,606). Overlap p-value 2,49E-09				
ID	Genes in dataset	Prediction (based on measurement ...	Expr	Fold Change
Q8NUL3	STAU2	Affected	↑	25,000
Q330K2	NDUFAF6	Affected	↑	25,000
Q9H0E3	SAP130	Affected	↑	25,000
Q9UBS8	RNF14	Affected	↑	25,000
Q8N608	DPP10	Affected	↑	25,000
P16422	EPCAM	Affected	↑	25,000
Q9H792	PEAK1	Affected	↑	3,736
Q15063-3	POSTN	Affected	↑	3,447
P02462	COL4A1	Affected	↑	3,421
Q9NVV5-3	AIG1	Affected	↑	3,355
Q14678	KANK1	Affected	↑	3,314
P30837	ALDH1B1	Affected	↑	3,231
Q9BVL2	NUP58	Affected	↑	2,963
P24941	CDK2	Affected	↑	2,761
Q9H9B1	EHMT1	Affected	↑	2,744
Q13459	MYO9B	Affected	↑	2,693
Q9BXP8	PAPPA2	Affected	↑	2,663
P52888	THOP1	Affected	↑	2,629
P21359	NF1	Decreased	↑	2,626
Q8IV19	NOSTRIN	Affected	↑	2,559
O60318	MCM3AP	Affected	↑	2,556
Q04864	REL	Affected	↑	2,553
P08572	COL4A2	Affected	↑	2,524
Q12789	GTFC1	Affected	↑	2,515
Q92766	RREB1	Affected	↑	2,381
Q8N201	INTS1	Affected	↑	2,277
P45954	ACAD5B	Affected	↑	2,256
Q96L91	EP400	Affected	↑	2,232
Q9Y224	YARS2	Affected	↑	2,191
Q8IZ83	ALDH16A1	Affected	↑	2,180
Q9UI10-2	EIF2B4	Affected	↑	2,179
Q96HPO	DOCK6	Affected	↑	2,131
Q8WTW3	COG1	Affected	↑	2,121
P26232	CTNNA2	Affected	↑	2,078
P78346	RPP30	Affected	↑	2,065
Q9BR22	TRIM56	Affected	↑	2,036
Q9Y5A9	YTHDF2	Affected	↑	2,015
P56945	BCAR1	Affected	↑	2,013
O14497	ARID1A	Affected	↑	1,993
Q9H2K8	TAOK3	Affected	↑	1,976
P09110	ACAA1	Affected	↑	1,963
P51003	PAPOLA	Affected	↑	1,943
Q9UHP3	USP25	Affected	↑	1,928
P51610	HCFC1	Affected	↑	1,911
Q9GZU2	PEG3	Affected	↑	1,908
Q460N5	PARP14	Affected	↑	1,905
Q9BXF6	RAB11FIP5	Affected	↑	1,891
Q99816	TSG101	Affected	↑	1,888
Q92539	LPIN2	Affected	↑	1,887
Q9Y520	PRRC2C	Affected	↑	1,879
O15228	GNPAT	Affected	↑	1,877
Q9UKS9	DBR1	Affected	↑	1,870
Q15555-5	MAPRE2	Affected	↑	1,857
P09917	ALOX5	Increased	↑	1,848
P27694	RPA1	Affected	↑	1,826
O60563	CCNT1	Affected	↑	1,824
Q8TEW0	PARD3	Affected	↑	1,803
Q99755-3	PIPSK1A	Affected	↑	1,796
Q13825	AUH	Affected	↑	1,793
Q99990	VGLL1	Affected	↑	1,791
P42229	STAT5A	Affected	↑	1,786
Q9BSJ2	TUBGCP2	Affected	↑	1,786
Q95159	ZFP11	Affected	↑	1,785
O76041-2	NEBL	Affected	↑	1,778
Q6P1M3	LLGL2	Affected	↑	1,778
P35658	NUP214	Affected	↑	1,757
P83436	COG7	Affected	↑	1,752
P07858	CTSB	Affected	↑	1,728
P42858	HTT	Affected	↑	1,703
P26368	U2AF2	Affected	↑	1,701
P12955	PEPD	Affected	↑	1,699
Q55WX8	ODR4	Affected	↑	1,678
Q13136	PPRA1	Affected	↑	1,678
Q9COB5	ZDHHCS	Affected	↑	1,650
Q9UQB8	BAIAP2	Affected	↑	1,648
Q9NUV7	SPTLC3	Affected	↑	1,628
Q86XA9	HEATR5A	Affected	↑	1,625
Q02487	DSC2	Affected	↑	1,615
O60504	SORBS3	Affected	↑	1,599
Q9UB89	TRIP11	Affected	↑	1,594
Q9BTX1	ND1	Affected	↑	1,594
Q7KZ17-15	MARK2	Affected	↑	1,590
Q9UIF9	BAZ2A	Affected	↑	1,588
P28288	ABCD3	Affected	↑	1,587
Q8TE68	EPS8L1	Affected	↑	1,583
Q9UBF2	COPG2	Affected	↑	1,583
P49915	GMP5	Affected	↑	1,562
P50750	CDK9	Affected	↑	1,560
Q9UPT8	ZC3H4	Affected	↑	1,556
Q9Y6W3	CAPN7	Affected	↑	1,550
Q07075	ENPEP	Affected	↑	1,540
Q7Z6E9	RBBP6	Affected	↑	1,530
Q96K37	SLC35E1	Affected	↑	1,529
Q69YN4	VIRMA	Affected	↑	1,529
P17301	ITGA2	Affected	↑	1,525
Q6IN85	PPP4R3A	Affected	↑	1,521
Q9ULC5	ACSL5	Affected	↑	1,507
P02746	C1QB	Affected	↓	-1,500
P13796	LCPI1	Affected	↓	-1,503

→ L'ensemble de ces résultats nous confirment le rôle primordial du placenta dans le développement cérébral du fœtus et la place privilégiée de la neuroplacentologie pour étudier l'impact de l'alcool au cours de la grossesse.

Que ce soit dans la partie 1 ou dans la partie 2 de ce manuscrit, nous avons pu observer l'impact majeur de l'alcool sur l'ensemble des fonctions placentaires et les différents acteurs impliqués. Le lien avec les désordres neuronaux observé chez les enfants TCAF a été étudié *via* la neuroplacentologie et montre à quel point le placenta peut être un réservoir de biomarqueurs placentaires d'exposition prénatale à l'alcool, et de façon spécifique, un réservoir de biomarqueurs placentaires de défauts cérébraux fœtaux imputés à l'exposition à l'alcool au cours de la grossesse.

Comme cela a été décrit dans l'introduction de la partie 2, le Dr Gonzalez et son équipe ont découvert et breveté, sur un modèle murin, des biomarqueurs placentaires d'alcoolisation *in utero* ayant un impact direct sur la mise en place du cerveau cortical du fœtus.

Dans notre recherche de caractérisation de biomarqueurs, en collaboration avec l'équipe du Dr Gonzalez, et notamment avec le Dr Sautreuil, nous avons donc, analysé chez la femme, les biomarqueurs retrouvés chez la souris et essayé de caractériser des biomarqueurs placentaires humains d'alcoolisation au cours de la grossesse.

PARTIE 3 :

**Caractérisation de biomarqueurs
placentaires d'alcoolisation au
cours de la grossesse**

Comme cela a été décrit dans l'introduction de ce manuscrit, la caractérisation de biomarqueurs d'alcoolisation *in utero* serait un bon en avant considérable pour le diagnostic et la prise en charge précoce des enfants atteints de TCAF à la naissance.

La partie 3 est divisée en deux sous parties :

- A. Impact de l'alcool *in vivo* sur l'angiogenèse placentaire
- B. Impact de l'alcool *in vivo* sur la survie cellulaire

Cette partie du manuscrit est à mettre en reflet avec les résultats obtenus précédemment et notamment la première partie du manuscrit portant sur la mise en évidence du Syndrome d'Alcoolisme Placentaire.

Cette première sous partie s'appuie sur les résultats de l'étude collaborative réalisée avec le Dr Sautreuil et les travaux précédents de l'équipe du Dr Gonzalez, tout particulièrement sur les marqueurs de l'angiogenèse. De plus, la caractérisation de biomarqueurs fœtaux permettant d'avoir un impact direct sur le développement du cerveau fœtal nous a amené à utiliser le modèle de perfusion comme un système permettant d'accéder à la circulation fœtale.

La deuxième sous partie est une « découverte fortuite » au fil des croisements de mes résultats et surtout grâce à l'analyse croisée du protéome avec celui du sécrétome (obtenu avec la récupération des perfusats fœtaux). Elle permet d'ouvrir des perspectives très intéressante à la recherche de biomarqueurs d'alcoolisation et l'étude de l'alcool *in vivo* de manière générale.

A. Impact de l'alcool *in vivo* sur l'angiogenèse placentaire

En 2017, le Dr Lecuyer et son équipe, ont permis de mettre en avant une découverte majeure dans la recherche de biomarqueurs d'alcoolisation *in utero* d'altération du développement fœtal chez un modèle murin. En effet, il a été démontré que l'alcool administré *in utero* à des souris gestantes engendrait une dérégulation de l'angiogenèse placentaire (notamment par la dérégulation négative de la sécrétion de PlGF), et que cette down-régulation du PlGF *in utero* avait un impact direct sur la dérégulation du réseau cortical des souriceaux à la naissance. Au cours de ses travaux de thèse, le Dr Sautreuil a aussi mis en évidence un acteur majeur de la voie de l'angiogenèse dérégulé par l'alcool : le CD146 (ces travaux sont en cours de publication).

La première partie de cette étude de caractérisation de biomarqueurs a donc été de vérifier l'effet de l'alcool sur ces deux biomarqueurs, d'alcoolisation chez la souris (brevetés) sur le placenta humain.

a) Impact de l'alcool sur le PlGF

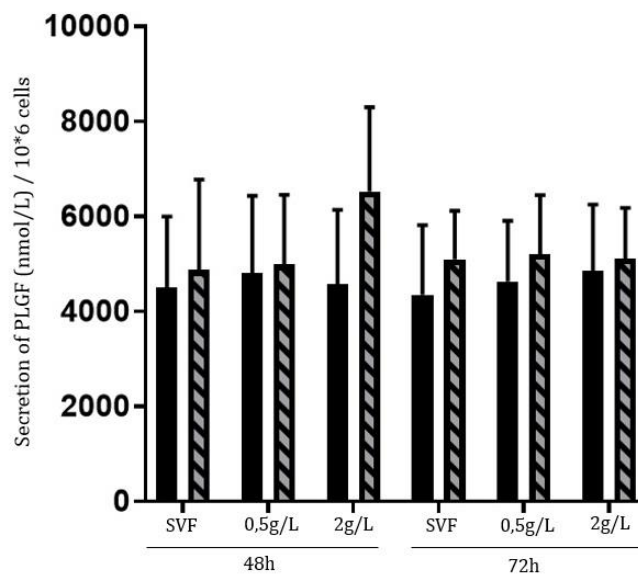


Figure 44- Effect of *in vivo* alcohol on secretion of PlGF (Placenta Growth Factor) *in vitro* ■ : Control n=5; ▨ : Alcohol n=5. Graphical representation of secretion of PlGF (nmol/L)/10⁶cells by VCT's primary culture for 24h-48h or 72h of incubation with SVF medium, exposed *in vitro* at [0.5g/l] or [2g/L] EtOH or not. Culture medium of each condition were collected, and PlGF was measured by automate on the Cochin Hospital platform Statistical test: ANOVA two way + Sidak's multiple comparisons test were made with Graph Pad® prism 7.0 software; P-value> 0.05.

Le PlGF (Placental Growth Factor), décrit dans l'introduction de ce manuscrit, est sécrété par le placenta et possède une activité fortement pro-angiogénique. Sa sécrétion, majoritaire du côté maternel, est finement régulée tout au long de la grossesse. La concentration de PlGF a été mesurée dans le surnageant des cultures primaires de CTV

issus de placentas « contrôles » (n=5) et de placentas exposés à l'alcool *in vivo* (n=5) (Figure 44), (sur)exposés ou non à l'alcool *in vitro*. L'alcool *in vivo* n'a pas d'impact significatif sur la sécrétion de PlGF des CTV en culture (p-value>0.05). L'exposition *in vitro* à l'alcool, que ce soit pour les CTV ayant déjà été exposés à l'alcool *in vivo* ou les CTV contrôles, n'a pas non plus d'effet significatif sur la sécrétion de PlGF ; Ce résultat peut sembler en contradiction avec les résultats obtenus *in vivo* sur le modèle murin. Néanmoins, il est important de souligner que toute hormone/facteur synthétisé par le trophoblaste sera principalement sécrété du côté maternel et non du côté fœtal. Ainsi, le surnageant d'une culture de trophoblastes *in vitro* représentera principalement le versant maternel et non fœtal d'un point de vue quantitatif.

b) Impact de l'alcool sur CD146

Un autre facteur pro-angiogénique, le CD146 a été démontré comme étant un acteur de l'axe placenta-cerveau impliqué dans la dérégulation corticale fœtale sur le modèle murin à la suite d'une exposition à l'alcool *in utero* (travaux de thèse du Dr Sautreuil).

Après avoir retrouvé son expression dans la villosité humaine (Figure 45) nous avons étudié son expression transcriptionnelle (Figure 46 (A)) et traductionnelle (Figure 46 (B)).

Une étude immunohistochimique a été mise au point et réalisée sur n=4 placentas exposés *in vivo* à l'alcool en comparaison avec n=4 placentas contrôles, à terme. Comme décrit dans la partie matériel et méthode, cette expérimentation a été réalisée sur les explants villositaires après 6 jours de changement quotidien de milieu puis ayant été exposés à [0.5g/L] ou [2g/L] d'alcool en comparaison avec un milieu SVF (contrôle) pendant 24h ou 48h.

La Figure 45 présente quatre villosités provenant de deux placentas différents et représentative des deux sous-groupes « contrôles » et « alcool » (n=4 placentas étudiés pour chaque groupe). Deux villosités proviennent d'un placenta issu d'une femme ayant consommé de l'alcool au cours de la grossesse et deux villosités sont des contrôles provenant de placentas de femmes n'ayant pas consommé d'alcool pendant leur grossesse. Les deux images du haut représente les villosités ayant été incubées 48h dans du SVF après les 6 jours de changement de milieu ; les deux images du bas représentent les villosités ayant été exposées 48h à 2g/L d'éthanol *in vitro*. Les flèches blanches

indiquent une localisation de cd146, notamment et principalement au niveau des vaisseaux villositaires. Le logiciel nous a permis de retrouver l'expression de CD146 dans le trophoblaste humain. En revanche, le design de notre expérimentation ne nous a pas permis de faire une analyse quantitative de fluorescence plus poussée de l'expression de CD146 entre les placentas « contrôles » et les placentas « alcool ».

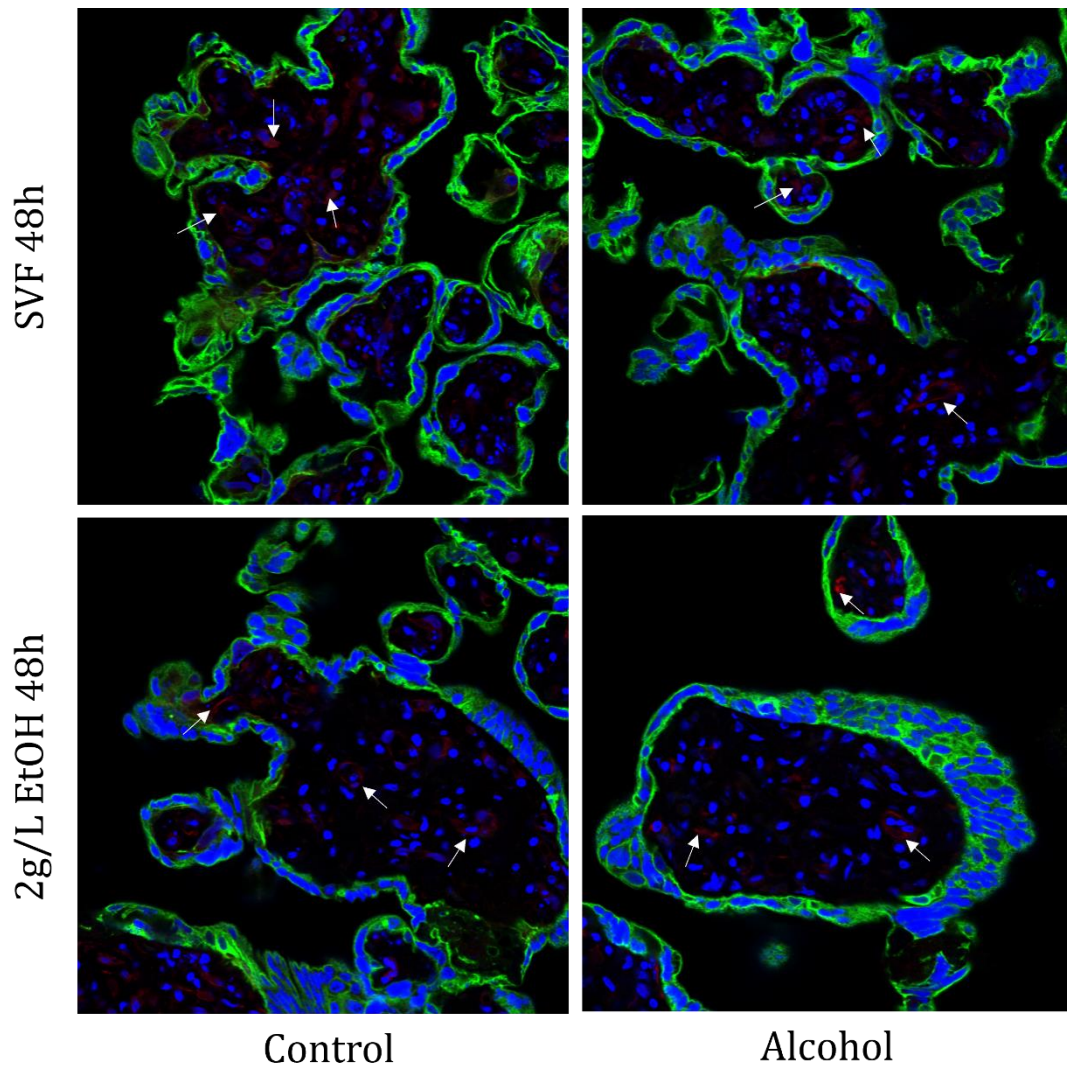


Figure 45- Study of expression of CD146 in trophoblast tissue. Villous explant of n=4 placenta "control" and n=4 placenta "alcohol" have been incubated in SVF for 6 day and then 3 treatment were assessed for 24h or 48h with SVF medium (control), SVF medium + [0.5g/L] ethanol or SVF medium+ [2g/L] ethanol. At the end of treatment, villi are fixed with PFA (like its described in material & methods), cut in 10 μ m slice and incubated with **CD146** (red), **DAPI** (blue) (nucleus) and **CK7** (green) (membrane and structure of villi) antibody. After fluorescent secondary antibody incubation and mounting of microscopy slides, villi have been watched on Leica confocal microscopy (x40 with oil). Here, the picture represents villi exposed or not to in vivo alcohol and sur-exposed to alcohol for 48h compared to SVF. Arrows have been placed at some interesting locations of CD146 label.

Une analyse de l'expression transcriptionnelle et traductionnelle a été réalisée également (Figure 46). L'analyse transcriptionnelle a été réalisée sur villosités (n=4) (résultats non montrés (NS)) et sur des cultures de trophoblastes isolés issus de placentas contrôles

ayant été exposés à l'alcool *in vitro* (n=6) (Figure 46 (A)). L'alcool *in vitro* n'a pas d'effet significatif sur l'expression transcriptionnelle de CD146.

L'analyse protéique a été réalisée sur des villosités (n=5) issus des quatre groupes « contrôles » terme (C), « alcool » terme (AL), « 1^{er} trimestre précoce » (EA) et « 1^{er} trimestre tardif » (LA) dans le cadre du protéome réalisé par la plateforme 3P5 PROTEOM'IC de Cochin (comme décrit dans la partie matériel et méthodes). L'expression protéique des villosités issues de placentas du premier trimestre est significativement basse par rapport aux villosités issues de placentas « contrôles » à terme (Figure 46 (B)). L'expression protéique de CD146 est donc évolutive au cours de la grossesse et augmente avec le temps. L'expression protéique de CD146 n'est pas significativement diminuée par l'alcool *in vivo* malgré la tendance observée.

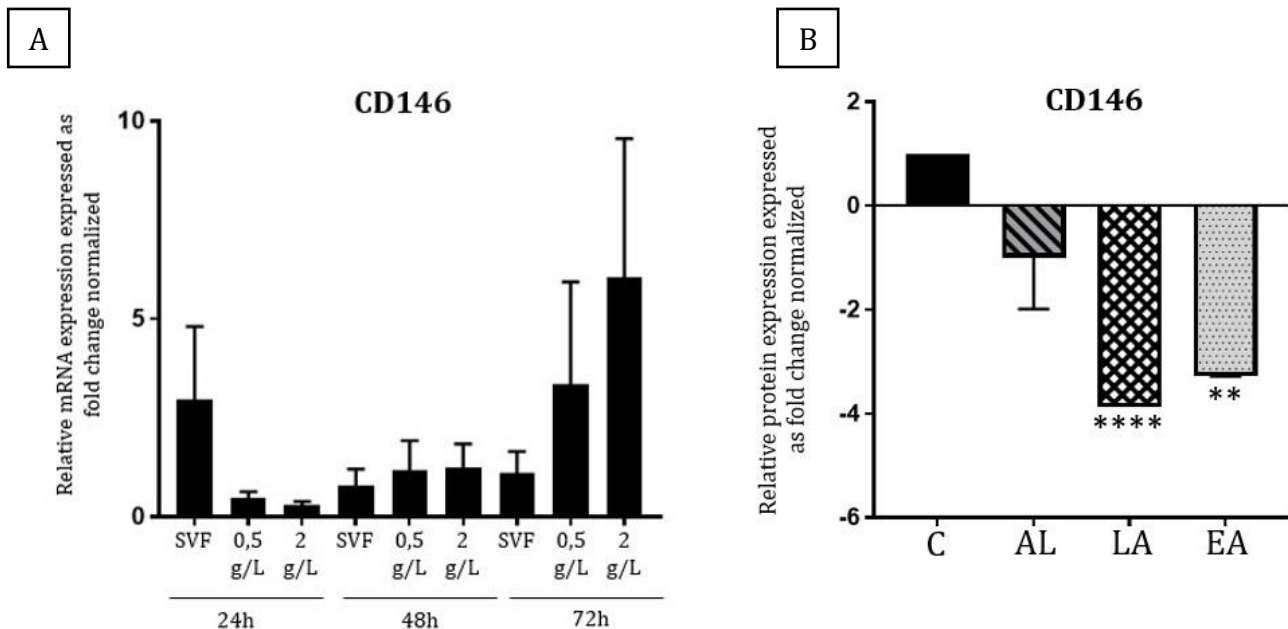


Figure 46- Effect of *in vivo* alcohol on CD146 expression and evolutionary cartography. A) Graphical representation of mRNA expression of *in vitro* alcohol effect on CD146. Primary VCT's cells (from placenta ■ : Control n=6) are incubated with SVF and exposed or not at [0.5g/L] or [2g/L] EtOH for 24h-48h or 72h. Statistical analyses are made by one way ANOVA- P-value > 0.05; P-value ≤ 0.05 (*); P-value ≤ 0.01 (**); P-value ≤ 0.001 (***) ; P-value ≤ 0.0001 (****). B) Graphical representation of protein expression of CD146. Proteomic analysis of Alcohol Villi (n=5), Late abortion villi (n=5) and Early abortion (n=5) in comparison to Control villi (n=5) were made by 3P5 proteom'IC platform at cochin hospital. Analysis of relative expression/fold change and statistical analysis were made by Maxquant®, Excel® and Ingenuity® and Graphpad prism software. Relative protein expression of CD146 is expressed in fold change normalized on control. Statistical analyses are made by Student test- P-value > 0.05; P-value ≤ 0.05 (*); P-value ≤ 0.01 (**); P-value ≤ 0.001 (***) ; P-value ≤ 0.0001 (****); ■ : Control n=5; ▨ : Alcohol n=5; ▩ : Later abortion n=5; ▪ : Early abortion n=5

- ➔ Malgré le fait qu'il soit retrouvé dans le trophoblaste humain, le CD146 ne semble pas être le biomarqueur prépondérant de la prise d'alcool *in vivo* chez la femme.
- ➔ L'angiogenèse placentaire restant tout de même être au centre de l'axe placenta-cerveau, nous avons étudié différents acteurs des voies pro et anti-angiogéniques.

c) Impact de l'alcool *in vivo* et *in vitro* sur différents acteurs de l'angiogenèse placentaire

En reprenant les données de la littérature avec l'ensemble des résultats obtenus, il a été possible de proposer un schéma regroupant les différentes voies conduisant à la régulation de l'angiogenèse et avec des candidats potentiels pouvant être impactés par l'alcool (Figure 47).

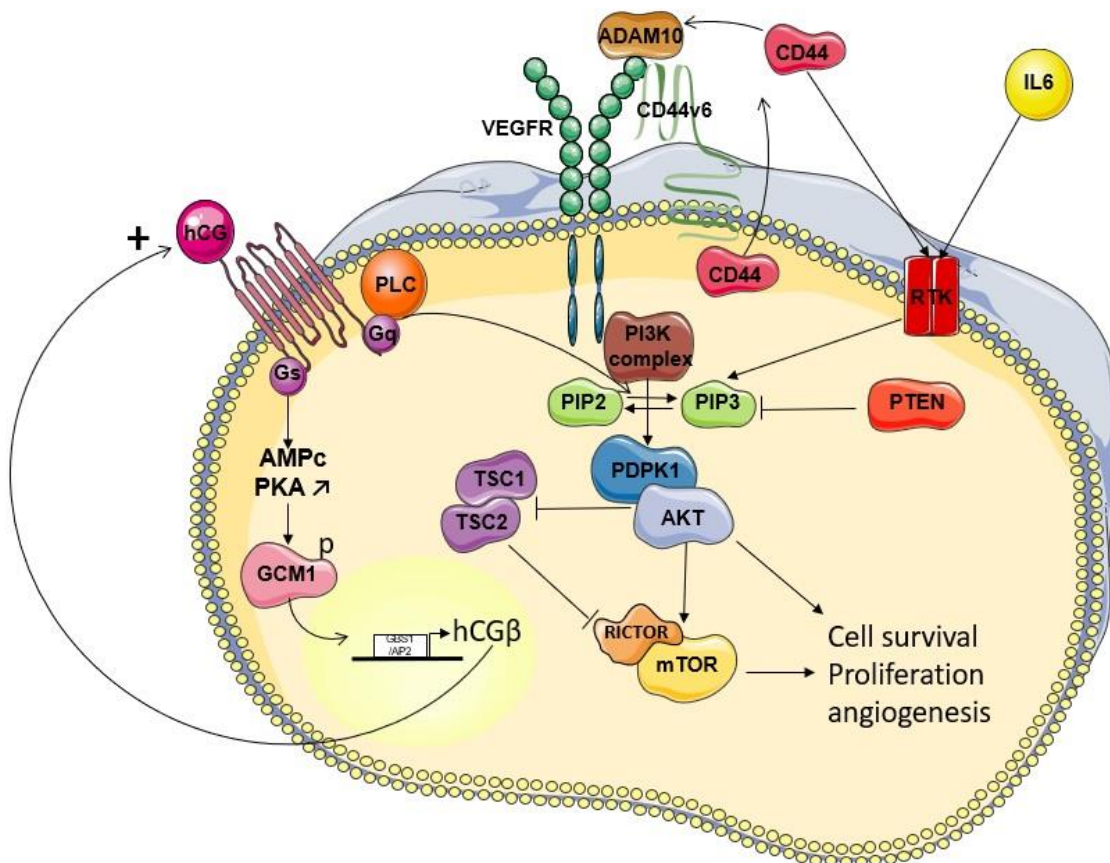


Figure 47- Synthesis of placental angiogenesis pathway in physiological way. CD44 is capable to complex with ADAM10 and bind to VEGF Receptor. This action enhances the activation PI3K/ AKT and mTOR pathway. Some regulators are implicated in this way like RTK receptor (which can be activated by IL6 and CD44 too) which is an activator of PI3K/AKT pathway; or PTEN which is an inhibitor of PI3K/AKT pathway. Another way represented on left side is the hCG/LH pathway; hCG can bind on his receptor and activate two ways: First is the activation of complex PLC/Gq-protein (an activator of PI3K/AKT); the second way is the activation by Gs protein of the AMPc/PKA pathway, which is a positive regulator of GCM1 (necessary to ST fusion). GCM1 is translocated in the nucleus and bind to GBS1 (which harbors an AP2-binding site). This action activates the expression of hCGβ which is released out and have positive feedback on hCG production.

En lien avec l'équipe du Dr Gonzalez, nous avons recherché plusieurs de ces molécules candidates potentielles Certains acteurs semblent jouer un rôle majeur de l'angiogenèse : c'est le cas de CD44, ADAM10 et PTEN.

➤ Impact de l'alcool *in vivo* sur l'expression de ADAM10 et cartographie évolutive

ADAM10 est une métalloprotéase pro-angiogénique. Son expression transcriptionnelle et traductionnelle a été étudiée sur n=5 villosités issus de placentas « alcool », n=5 villosités de placentas « 1^{er} trimestre précoce » et « 1^{er} trimestre tardif » en comparaison avec n=5 villosités « contrôles ».

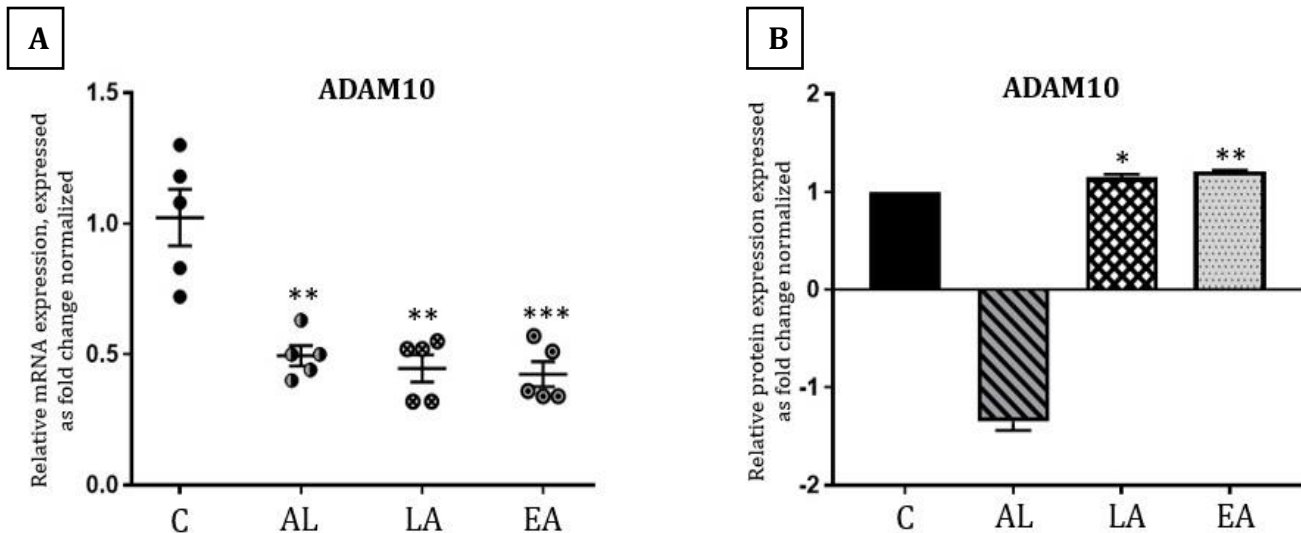


Figure 48- Effect of *in vivo* alcohol on ADAM10 expression and evolutionary cartography. A) Graphical representation of mRNA expression of ADAM10 in villi. 4 types of villi are analysed: C= term control; AL= *In vivo* alcohol Term; LA= Late abortion (without alcohol); EA = Early abortion (without alcohol). Relative mRNA expressions are obtained by qPCR analysis (Qiagen RT2 profiler custom plate) and are expressed in fold change normalized on control. Statistical analyses are made with Graphpad prism, by t-test with consistent SD- P-value > 0.05; P-value ≤ 0.05 (*); P-value ≤ 0.01 (**); P-value ≤ 0.001 (***) ; P-value ≤ 0.0001 (****). B) Graphical representation of protein expression of ADAM10. Proteomic analysis of Alcohol Villi (n=5), Late abortion villi (n=5) and Early abortion (n=5) in comparison to Control villi (n=5) were made by 3P5 proteom'IC platform at cochin hospital. Analysis of relative expression/ fold change and statistical analysis were made by Maxquant®, Excel® and Ingenuity® and Graphpad prism software. Relative protein expression of ADAM10 is expressed in fold change normalized on control. Statistical analyses are made by Student test- P-value > 0.05; P-value ≤ 0.05 (*); P-value ≤ 0.01 (**); P-value ≤ 0.001 (***); ■ : Control n=5; ▨ : Alcohol n=5; ▩ : Later abortion n=5; ▧ : Early abortion n=5.

L'expression transcriptionnelle de ADAM10 a été étudiée par qPCR ; celle-ci est significativement altérée par l'exposition à l'alcool *in vivo* (Figure 48 (A)). L'expression relative des ARN messagers d'ADAM10 a été significativement diminuée dans les villosités « alcool » en comparaison avec des villosités « contrôles ». De manière intéressante, les niveaux d'expression d'ADAM10 par les villosités « alcool » est semblable aux niveaux retrouvés dans des villosités issues de placentas du premier trimestre.

Par ailleurs, une analyse protéomique a également été réalisée comme décrit précédemment sur des villosités issues de femmes ayant consommé de l'alcool au cours

de leur grossesse (n=5) à terme, des villosités issues de placentas du 1^{er} trimestre « précoce » (n=5) ou « tardif » (n=5) en comparaison avec des villosités issues de femmes « contrôles » à terme (n=5). De nouveau, l'expression relative de ADAM10 montre une tendance à la diminution dans les villosités exposées à l'alcool (Figure 48 (B)) ; néanmoins cette diminution n'est pas significative (FC =-1.35 ; p-value= 9.09E-02). De manière étonnante, l'expression protéique d'ADAM10 dans les villosités de 1^{er} trimestre est surexprimée par rapport aux « contrôles ».

- ➔ L'expression d'ADAM10 est altérée par l'exposition à l'alcool *in vivo* dans les villosités.
- ➔ L'alcool diminue significativement l'expression transcriptionnelle de ADAM10.

➤ Impact de l'alcool *in vivo* sur l'expression CD44 et cartographie évolutive

CD44 est une glycoprotéine pro-angiogénique qui régule également l'invasion cellulaire.

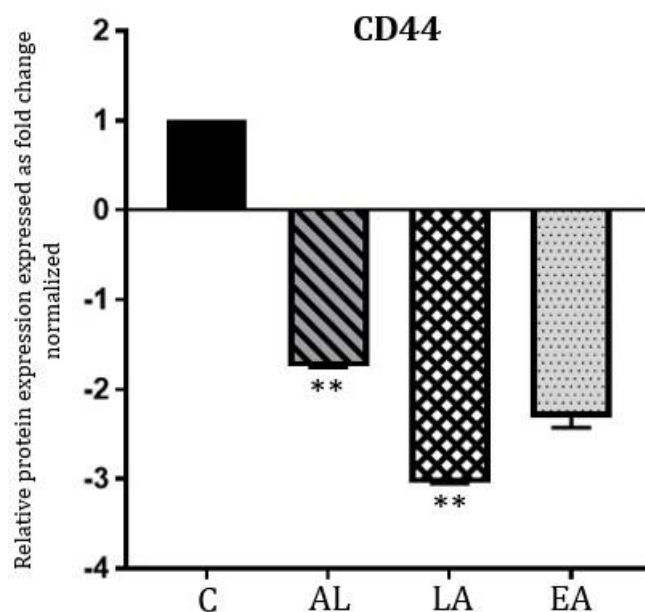


Figure 49- Effect of *in vivo* alcohol on CD44 expression and evolutionary cartography. Graphical representation of protein expression of CD44. Proteomic analysis of Alcohol Villi (n=5), Late abortion villi (n=5) and Early abortion (n=5) in comparison to Control villi (n=5) were made by 3P5 proteom'IC platform at cochin hospital. Analysis of relative expression/ fold change and statistical analysis were made by Maxquant®, Excel® and Ingenuity® and Graphpad prism software. Relative protein expression of CD44 is expressed in fold change normalized on control. Statistical analyses are made by Student test- P-value > 0.05; P-value ≤ 0.05 (*); P-value ≤ 0.01 (**); ■ : Control n=5; ▨ : Alcohol n=5; ▩ : Later abortion n=5; ▧ : Early abortion n=5.

L'expression protéique de CD44 a été étudiée sur n=5 villosités issus de placentas « alcool », n=5 villosités de placentas « 1^{er} trimestre précoce » et « 1^{er} trimestre tardif » en comparaison avec n=5 villosités « contrôles » (Figure 49).

L'analyse du protéome a permis de démontrer l'altération de CD44 par l'alcool *in vivo*. L'expression relative protéique de CD44 a été diminuée significativement dans les villosités exposées à l'alcool (FC = -1.75 ; p-value= 9.0^E-03). De manière intéressante, là encore, les villosités issues de placenta du 1^{er} trimestre présentent des niveaux bas d'expression protéique de CD44, semblables à ceux obtenus par l'exposition à l'alcool (à noter que les villosités issues du 1^{er} trimestre précoce présente un Fold change significatif (FC= -2.32) mais une p-value > 0.05 et ne sont donc pas considérés comme significatif).

➤ Impact de l'alcool sur PTEN et cartographie évolutive

PTEN est une protéine régulatrice de l'angiogenèse. Notamment elle régule la voie de signalisation PI3K/AKT en l'inhibant. Son expression transcriptionnelle et traductionnelle a été étudiée sur les cultures primaires de CTV (n=6 contrôles et n=6 alcools) et sur n=5 villosités issus de placentas « alcool », n=5 villosités de placentas « 1^{er} trimestre précoce » et « 1^{er} trimestre tardif » en comparaison avec n=5 villosités « contrôles ».

L'expression transcriptionnelle de PTEN a été étudiée par qPCR ; Deux modèles ont permis de l'étudier : les villosités chorales issues des quatre groupes (précédemment décrits) (Figure 50 (A)) et trophoblastes issus de culture primaire de CTV provenant de n=6 placentas « alcool » en comparaison à n=6 placentas « contrôles » (Figure 50 (B)). L'expression relative des ARN messagers de PTEN a été significativement diminuée dans les villosités « alcool » en comparaison avec des villosités « contrôles ». (Figure 50 (A)). Cette diminution ne s'observe pas significativement sur les cellules primaires trophoblastiques. En revanche, l'ajout d'une dose de 0,5g/L d'alcool *in vitro* en surexposition pendant 48h ou l'ajout d'une dose de 2g/L d'alcool *in vitro* en surexposition pendant 72h, diminue significativement l'expression relative de la transcription de PTEN par rapport aux cellules « contrôles » dans les mêmes conditions de culture et d'exposition *in vitro* ([0.5g/L] EtOH 48h et [2g/L] EtOH 72h) (Figure 50 (B)). De manière intéressante, pour PTEN également, les niveaux de son expression transcriptionnelle des villosités

« alcool » est semblable aux niveaux retrouvés dans des villosités issues de placentas du premier trimestre.

L'analyse traductionnelle (protéome) a également été réalisée comme décrit précédemment sur n=5 villosités des quatre groupes. Seul un sur cinq des placentas « alcool » (AL1) exprime la protéine en comparaison avec trois sur cinq placentas contrôles. Le FC représenté sur le graphique (Figure 50 (C)) représente donc l'expression protéique d'un seul placenta « alcool » et n'a pas de valeur significative. Également la non-

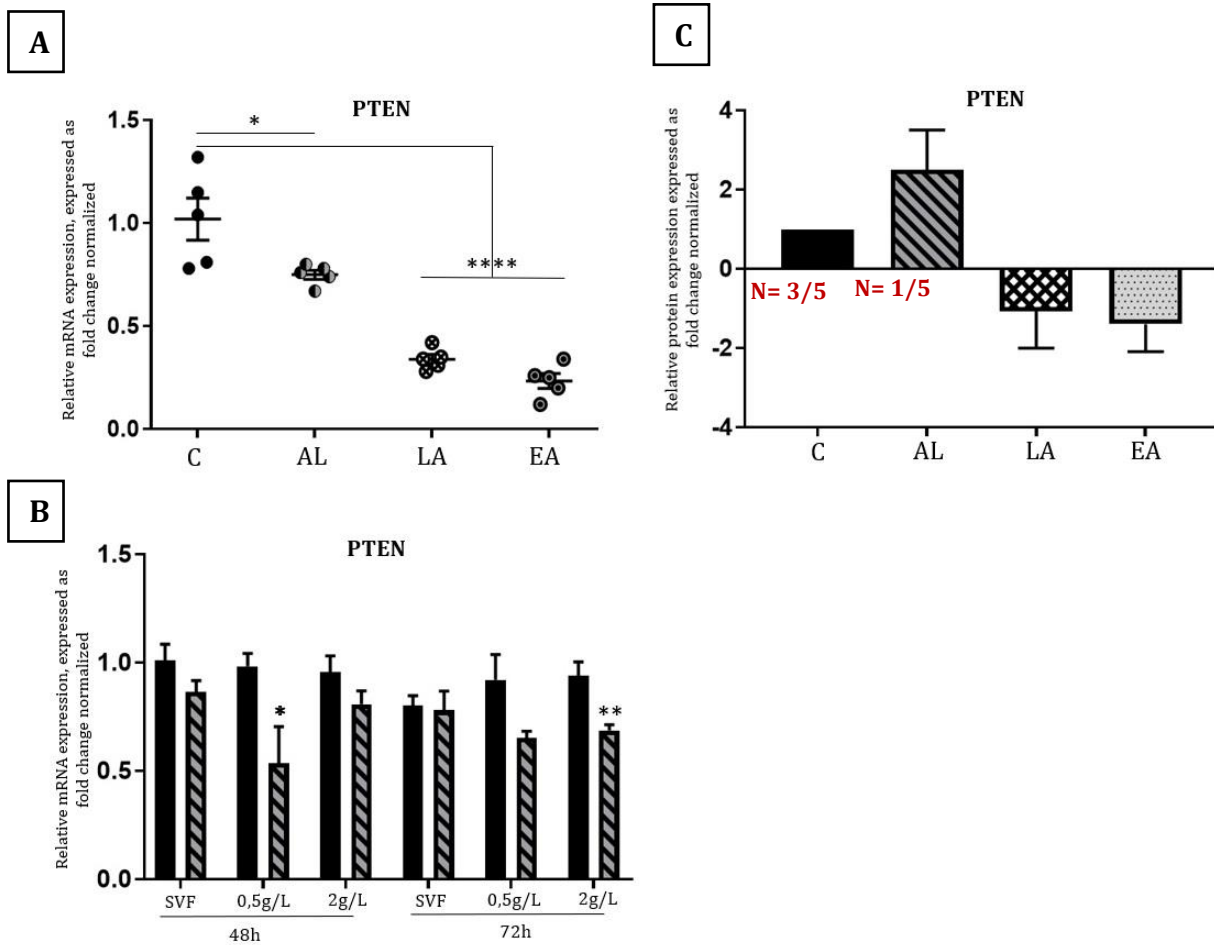


Figure 50- Effect of in vivo alcohol on PTEN expression and evolutionary cartography. A) Graphical representation of mRNA expression of PTEN in villi. 4 types of villi are analysed: C= term control; AL= Alcohol in vivo Term; LA= Late abortion (without alcohol); EA = Early abortion (without alcohol). Relative mRNA expressions are obtained by qPCR analysis (Qiagen RT2 profiler custom plate) and are expressed in fold change normalized on control. Statistical analyses are made with Graphpad prism, by t-test with consistent SD- P-value > 0.05; P-value ≤ 0.05 (*); P-value ≤ 0.01 (**); P-value ≤ 0.001 (***) ; P-value ≤ 0.0001 (****). B) Graphical representation of mRNA expression of PTEN in cells from VCT primary culture. Cells from control placenta (■ : Control n=6 and ▨ : Alcohol n=6) are incubated with SVF with or without [0.5g/l] or [2g/L] EtOH for 24h-48h or 72h. Relative mRNA expressions are obtained by qPCR analysis (Qiagen RT2 profiler custom plate) and are expressed in fold change normalized on control. Statistical analyses are made with Graphpad prism, by multiple t-test with consistent SD- P-value > 0.05; P-value ≤ 0.05 (*); P-value ≤ 0.01 (**); P-value ≤ 0.001 (***) ; P-value ≤ 0.0001 (****). C) Graphical representation of protein expression of GCM1. Proteomic analysis of Alcohol Villi (n=5), Late abortion villi (n=5) and Early abortion (n=5) in comparison to Control villi (n=5) were made by 3P5 proteomic platform at cochin hospital. Analysis of relative expression/ fold change and statistical analysis were made by Maxquant®, Excel® and Ingenuity® and Graphpad prism software. Relative protein expression of GCM1 is expressed in fold change normalized on control. Statistical analyses are made by Student test- P-value > 0.05; P-value ≤ 0.05 (*); P-value ≤ 0.01 (**); P-value ≤ 0.001 (***) ; P-value ≤ 0.0001 (****); ■ : Control n=5; ▨ : Alcohol n=5; ▩ : Later abortion n=5; ▪ : Early abortion n=5.

expression de PTEN par quatre sur cinq des placentas ne peut pas être considérée de manière statistique du fait que seuls trois sur cinq des placentas « contrôles » expriment la protéine.

- ➔ L'ensemble de ces résultats montre une altération importante de la voie de signalisation de l'angiogenèse par l'alcool *in vivo*.
- ➔ Du fait de l'augmentation très significative de l'hCG par l'alcool *in vivo*, une deuxième voie de l'angiogenèse impliquant le récepteur de l'hCG a été étudié. Un acteur majeur de cette voie, GCM1 est exprimé dans le trophoblaste et impliqué directement dans le contrôle de la syncytialisation des CTV en ST.

➤ Impact de l'alcool sur l'expression de GCM1 et cartographie évolutive

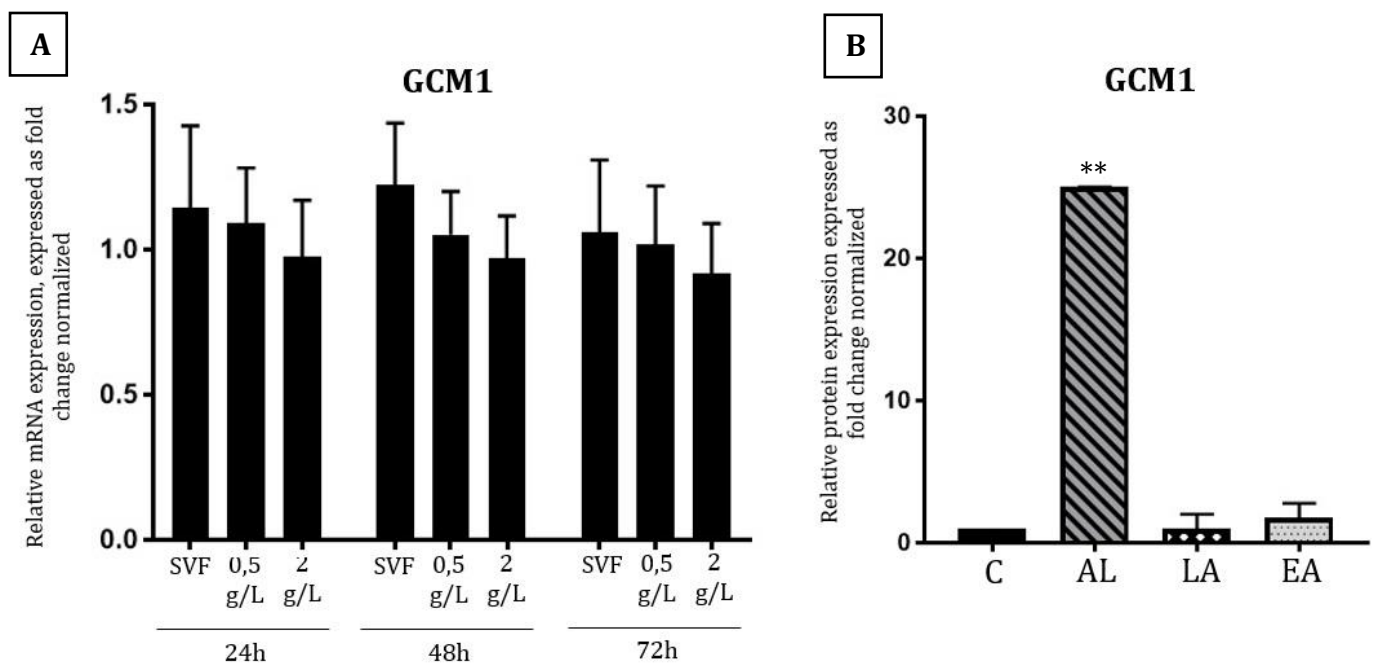


Figure 51- Effect of *in vivo* alcohol on GCM1 expression and evolutionary cartography. A) Graphical representation of mRNA expression of GCM1 in control cells. Cells from control placenta (■ : Control n=6) are incubated with SVF with or without [0.5g/l] or [2g/L] EtOH for 24h-48h or 72h. Relative mRNA expressions are obtained by qPCR analysis (Qiagen RT2 profiler custom plate) and are expressed in fold change normalized on control. Statistical analyses are made with Graphpad prism, by multiple t-test with consistent SD- P-value > 0.05; P-value ≤ 0.05 (*); P-value ≤ 0.01 (**); P-value ≤ 0.001 (***) ; P-value ≤ 0.0001 (****). B) Graphical representation of protein expression of GCM1. Proteomic analysis of Alcohol Villi (n=5), Late abortion villi (n=5) and Early abortion (n=5) in comparison to Control villi (n=5) were made by 3P5 proteom'IC platform at cochin hospital. Analysis of relative expression / fold change and statistical analysis were made by Maxquant®, Excel® and Ingenuity® and Graphpad prism software. Relative protein expression of GCM1 is expressed in fold change normalized on control. Statistical analyses are made by Student test- P-value > 0.05; P-value ≤ 0.05 (*); P-value ≤ 0.01 (**); ■ : Control n=5; ▨ : Alcohol n=5; ● : Later abortion n=5; ▤ : Early abortion n=5.

L'expression transcriptionnelle et traductionnelle de GCM1 a été étudiée sur les cultures primaires de CTVs (n=6 contrôles) et sur n=6 villosités issus des quatre groupes précédemment étudiés.

L'expression transcriptionnelle de GCM1 a été étudiée par qPCR à partir de trophoblastes issus de culture primaire de CTV « contrôles » exposés à l'alcool *in vitro*. Malgré une tendance observée sur le graphique, l'expression relative des ARN messagers de GCM1 n'est pas significativement modifiée pour les cellules exposées à l'alcool *in vitro* par rapport aux cellules « contrôles » (Figure 51 (A))

L'analyse traductionnelle (protéome) a également été réalisée comme décrit précédemment sur n=5 villosités des quatre groupes. L'expression protéique de GCM1 est très significativement augmentée dans les villosités exposées à l'alcool *in vivo* en comparaison aux villosités « contrôles ». Les niveaux d'expression protéique ne changent pas au cours de la grossesse.

→ La voie de signalisation de l'hCG impliquant son récepteur et GCM1 est significativement up-régulée par l'alcool *in vivo*, allant dans le sens de l'augmentation très significative de la sécrétion d'hCG par les cellules et explants issus de femmes ayant consommé de l'alcool au cours de leur grossesse.

B. Implication de l'alcool *in vivo* dans les voies de signalisation de l'apoptose cellulaire, senescence et prolifération non contrôlée (implication dans les cancers)
Comme cela a été évoqué en début de la partie, l'analyse du protéome des quatre groupes de villosités (AL, C, EA, LA) et l'analyse du secrétome du compartiment fœtal des placentas contrôles perfusés à l'alcool du côté maternel à une concentration [2g/L] pendant 2h (décrit dans la partie matériel et méthodes) nous ont conduit à analyser l'impact de l'alcool sur les voies de signalisation de l'apoptose et la senescence. Ces deux voies, lorsqu'elles ne sont plus contrôlées peuvent conduire à une prolifération cellulaire anarchique et augmenter les risques d'atteintes cancéreuses.

Au regard des résultats sur la voie de signalisation mTOR et celle des MAPK, le premier marqueur de senescence étudié a donc été celui des ROS (espèces réactive à l'oxygène).

➤ Impact de l'alcool sur la signalisation des ROS

Les espèces réactives à l'oxygène sont bien étudiées dans la littérature puisque leur dérégulation est directement liée à de nombreuses pathologies. De ce fait, l'équilibre de cette voie est primordial à la survie de l'organisme. Comme cela a été décrit dans les parties précédentes de ce manuscrit, le logiciel Ingenuity™ nous permet, *via* sa banque de données internes « *diseases and functions* », de croiser les résultats en protéines différentielles obtenues lors de nos analyses avec les fonctions et pathologies connues du logiciel.

La signalisation du métabolisme des ROS a donc été croisée avec nos données de protéomique (n=5 villosités « alcool » comparées avec n=5 villosités « contrôle ») et montre une dérégulation significative du métabolisme des ROS par l'alcool *in vivo* (p-value= 1.74E-03 mais z-score NS (-0.449)) (Figure 52). 24 protéines impliquées dans le métabolisme des ROS sont impactées significativement par l'alcool *in vivo*. De fait, l'expression protéique relative de ALOX5, STAT5A, PEGAM5, HTT, HCK est significativement augmentée dans les villosités « alcool » en comparaison avec les placentas « contrôles ». L'expression protéique relative de APOA4, BAK1, CD44, CRYAB, DCN, FAS, FBP1, FTH1, IRF6, ITGAM, LGALS3, NOL3, PON2, RAB27A, RBP4, SERPINF1, SLC9A3R1, TF, APOA1 est significativement diminuée dans les villosités « alcool » en comparaison avec les villosités « contrôles ».

Ces protéines sont impliquées également dans la survie cellulaire et les fonctions de prolifération. Notamment 17 de ces protéines sont impliquées dans la signalisation de cancer (dont 10 sont impliquées directement dans la signalisation du cancer du sein). Trois protéines sont impliquées dans la prédiction de cancer colorectal.

➤ Impact de l'alcool *in vitro* sur le modèle de perfusion

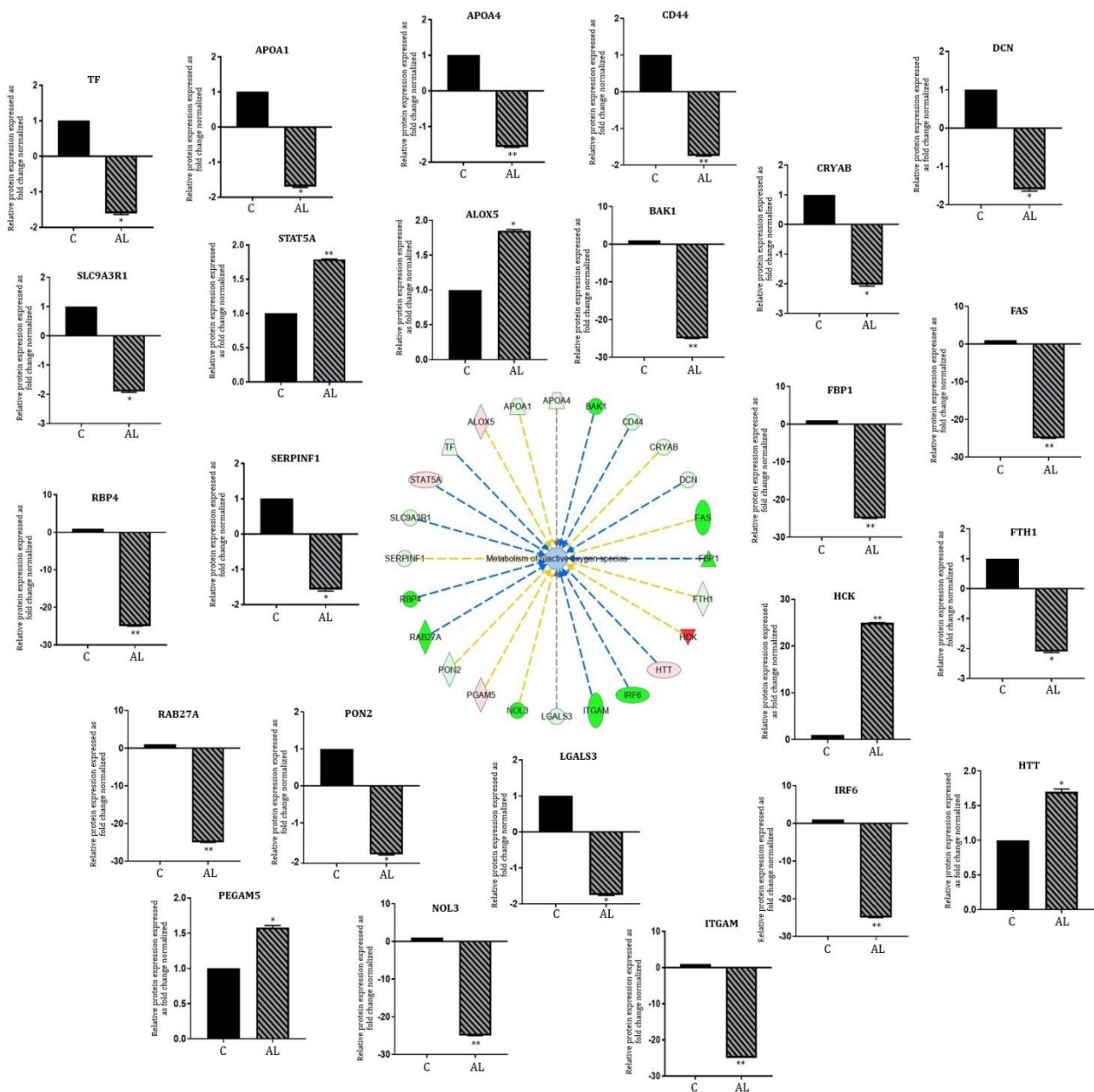


Figure 52- Effect of *in vivo* alcohol on metabolism of reactive oxygen species. Analysis on proteome of Alcohol Villi (n=5) in comparison to Control villi (n=5) were made by 3P5 proteom^{IC} platform at cochin hospital. Analysis of relative expression/ fold change/ z-score and statistical analysis were made by Maxquant®, Excel® and Ingenuity® software. Schematic representation of effect of *in vivo* alcohol on metabolism of reactive oxygen species Ingenuity display network. All legends are described on link: https://qiagen.secure.force.com/KnowledgeBase/articles/Basic_Technical_Q_A/Legend. Graphical representation of *in vivo* alcohol effect on 24 proteins implicated in metabolism of ROS. Relative protein expressions of APOA4, BAK1, CD44, CRYAB, DCN, FAS, FBP1, FTH1, HCK, HTT, IRF6, ITGAM, LGALS3, NOL3, PEGAM5, PON2, RAB27A, RBP4, SERPINF1, SLC9A3R1, STAT5, TF, ALOX5, APOA1 are expressed in fold change normalized on control. Statistical analyses are made by Student test- P-value > 0.05; P-value ≤ 0.05 (*); P-value ≤ 0.01 (**);

Afin de voir quelles protéines étaient retrouvées du côté fœtal sous l'effet de l'alcool nous avons perfusé des placentas de patientes « contrôles » avec une solution de maternelle supplémentée en alcool à une concentration de [2g/L] pour n=5 placentas (P6 à P10 =

placentas « alcool *in vitro* ») en comparaison avec n=5 placentas « contrôles » perfusés par une solution physiologique (P1 à P5 = placentas « contrôles sans alcool »). L'étude du secrétome a été réalisé sur le compartiment fœtal perfusé *via* le compartiment maternel à l'alcool *in vitro* ([2g/L] pendant 2 heures).

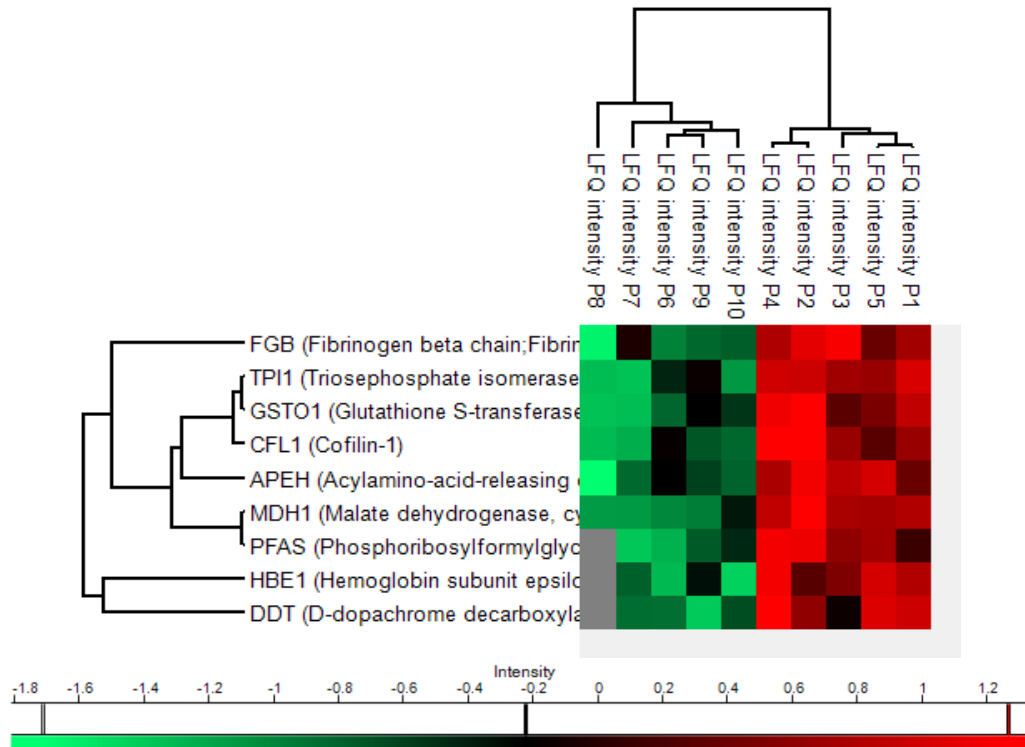


Figure 53- Impact of *in vitro* alcohol on placental secretions in perfusion model. Heatmap t-test with FDR (Benjamin Hochberg) (statistical test made by MAXQUANT and Perseus software (z-score protein (t-test) and significant FDR (Benjamin Hochberg))). Placenta from control patient were perfused during 2h with:

- for control placenta (P1->P5): physiological solution (EARL's solution) + Antipyrine,
 - for alcohol perfused placenta (P6->P10): physiological solution (EARL's solution) + Antipyrine + [2g/L] of EtOH
- Foetal eluates were collected and concentrated 10x by Placentech platform from Prem'up fundation and protein's secretome were performed by an external platerform (3P5 proteom'IC platform at cochin hospital). 9 Secreted placental proteins were significantly altered by 2h of alcohol perfusion.

L'analyse du « secrétome » a été réalisé comme décrit dans la partie matériel et méthode, par la plateforme Proteom'IC 3P5 de l'hôpital Cochin par chromatographie sur TIMTOF. Les résultats de la chromatographie ont été analysés par les logiciels Perseus™ et MAXQUANT™ et les statistiques ont été réalisées par un t-test avec une p-value corrigée par un test Benjamin Hochberg (FDR à 0.01 sur au moins 75% de valeur valides ; c'est-à-dire au moins quatre placentas présentaient la protéine pour au moins un des deux groupes).

La présence relative de 9 protéines a été altérée par le passage de l'alcool à travers la barrière placentaire (Figure 53). Notamment, la présence de FGB, TPI1, GSTO1, CFL1, APEH, PFAS, HBE1, DDT a été retrouvée et est diminuée par le passage transplacentaire

de l'alcool *in vitro* (avec des valeurs de FC comprises entre -2,857 et -1.04377 et une p-value corrigée comprise entre 7.86^{E-06} et 9.61^{E-04}). Fait intéressant, la dérégulation de certaines de ces protéines est impliquée dans la signalisation des cancers colorectaux et des cancers du sein dans la littérature.

➔ L'ensemble de ces résultats nous pousse à nous poser la question de l'implication de l'alcool *in vivo* sur la signalisation des cancers.

➤ Alcool *in vivo* et activation des voies cancéreuses

En croisant les données obtenues en analyses protéomiques (n=5 villosités « alcool » en comparaison avec n=5 villosités « contrôles ») avec les banques de données « *diseases and functions* » du logiciel Ingenuity™, nous avons pu observer l'implication de l'alcool *in vivo* dans la signalisation de diverses pathologies.

Par analyses du nombre de protéines impliquées dans la pathologie, le z-score et la p-value de chacune des voies de la pathologie, le logiciel Ingenuity™ détermine que la pathologie la plus touchée de sa banque de données est celle des cancers avec 252 protéines dérégulées par l'alcool *in vivo*, ayant un impact direct sur la signalisation cancéreuse au sein des villosités (avec un p-value comprise entre 1.60^{E-30} et 2.58^{E-03}).

Parmi le groupe général du cancer regroupant 238 fonctions impliqués dans les cancers, 8 fonctions ont été significativement prédites comme étant activées par l'alcool *in vivo* (Tableau 21) avec un z-score > 2 et 17 fonctions ont été potentiellement activées (z-score > 1.5 et p-value significative). Parmi les 8 fonctions activées par l'alcoolisation *in vivo*, il a été retrouvé majoritairement les voies de signalisation conduisant à la production de tumeurs solides et de carcinome. Ces résultats témoignent d'une dérégulation très importante de l'angiogenèse et la prolifération cellulaire.

Table 21- Effect of *in vivo* alcohol on Functions for Cancer. Analysis on proteome of Alcohol Villi (n=5) in comparison to Control villi (n=5) were made by 3P5 proteom'IC platform at cochin hospital. Analysis of relative expression/ fold change/ z-score and statistical analysis were made by Maxquant®, Excel® and Ingenuity® software. Analyse of the impact of alcohol on Endocrine System Disorders. 181 molecular implicated in cancer functions are affected significantly by *in vivo* alcohol (p-value<0.05. Fisher test); 8 Diseases and Functions pathway are Activated by alcohol with p- value<0.05 (fisher test) and z-score> 2 (student test)

The Filter found 238 Functions for Cancer There are 181 unique molecules selected

Categories	Diseases or Functions Annotation	p-value	Predicted Activation State	Activation z-score	Molecules	# Molecules
Cancer,Organismal Injury and Abnormaliti...	Non-melanoma solid tumor	9,00E-30	Increased	2,453	↑A1BG, ↑AASDHPT, ↑ABCD3, ...	251
Cancer,Organismal Injury and Abnormaliti...	Carcinoma	4,41E-30	Increased	2,428	↑A1BG, ↑AASDHPT, ↑ABCD3, ...	250
Cancer,Organismal Injury and Abnormaliti...	Abdominal carcinoma	4,23E-27	Increased	2,412	↑A1BG, ↑AASDHPT, ↑ABCD3, ...	239
Cancer,Organismal Injury and Abnormaliti...	Extracranial solid tumor	1,02E-28	Increased	2,246	↑A1BG, ↑AASDHPT, ↑ABCD3, ...	252
Cancer,Organismal Injury and Abnormaliti...	Anogenital cancer	6,51E-17	Increased	2,216	↑A1BG, ↑AASDHPT, ↑ACAA1, ...	187
Cancer,Organismal Injury and Abnormaliti...	Genitourinary carcinoma	1,24E-14	Increased	2,216	↑A1BG, ↑AASDHPT, ↑ACADSB, ...	183
Cancer,Gastrointestinal Disease,Organis...	Development of digestive organ tumor	5,76E-12	Increased	2,159	↑ABCD3, ↑ACAA1, ↑ACSL4, ...	153
Cancer,Organismal Injury and Abnormaliti...	Nonhematologic malignant neoplasm	1,20E-29	Increased	2,123	↑A1BG, ↑AASDHPT, ↑ABCD3, ...	251
Cancer,Organismal Injury and Abnormaliti...	Breast or gynecological cancer	1,95E-13		1,980	↑A1BG, ↑AASDHPT, ↑ACAA1, ...	162
Cancer,Organismal Injury and Abnormaliti...	Non-hematological solid tumor	1,60E-30		1,940	↑A1BG, ↑AASDHPT, ↑ABCD3, ...	252
Cancer,Organismal Injury and Abnormaliti...	Thoracic neoplasm	1,06E-03		1,916	↑AFM, ↑ALDH1B1, ↑ALOX5, ...	89
Cancer,Organismal Injury and Abnormaliti...	Respiratory system tumor	1,09E-03		1,916	↑A1BG, ↑AFM, ↑ALDH1B1, ...	96
Cancer,Organismal Injury and Abnormaliti...	Malignant solid tumor	1,82E-28		1,810	↑A1BG, ↑AASDHPT, ↑ABCD3, ...	252
Cancer,Hematological Disease,Immunolog...	Neoplasia of leukocytes	1,95E-03		1,784	↑ACADSB, ↑AIG1, ↑ALOX5, ...	58
Cancer,Organismal Injury and Abnormaliti...	Formation of solid tumor	8,94E-24		1,767	↑A1BG, ↑AASDHPT, ↑ABCD3, ...	229
Cancer,Organismal Injury and Abnormaliti...	Lung tumor	1,38E-03		1,719	↑AFM, ↑ALDH1B1, ↑ALOX5, ...	88
Cancer,Organismal Injury and Abnormaliti...	Development of carcinoma	2,10E-19		1,670	↑A1BG, ↑AASDHPT, ↑ABCD3, ...	202
Cancer,Organismal Injury and Abnormaliti...	Mammary tumor	5,01E-07		1,660	↑ACAA1, ↑AEBP1, ↑AIG1, ...	81
Cancer,Hematological Disease,Immunolog...	Lymphoma	1,31E-03		1,589	↑ACADSB, ↑ALOX5, ↑ARID1A, ...	42
Cancer,Hematological Disease,Immunolog...	Tumorigenesis of lymphocytes	1,70E-03		1,589	↑ACADSB, ↑AIG1, ↑ALOX5, ...	56
Cancer,Organismal Injury and Abnormaliti...	Genitourinary tumor	4,39E-15		1,582	↑A1BG, ↑AASDHPT, ↑ACAA1, ...	194
Cancer,Hematological Disease,Immunolog...	Lymphocytic cancer	1,43E-03		1,578	↑ACADSB, ↑AIG1, ↑ALOX5, ...	60
Cancer,Hematological Disease,Organisma...	Lymphocytic neoplasm	1,48E-03		1,578	↑ACADSB, ↑AIG1, ↑ALOX5, ...	60
Cancer,Hematological Disease,Organisma...	Hematologic cancer of cells	2,46E-03		1,578	↑ACADSB, ↑AIG1, ↑ALOX5, ...	54
Cancer,Organismal Injury and Abnormaliti...	Incidence of tumor	1,15E-21		1,520	↑A1BG, ↑AASDHPT, ↑ABCD3, ...	212
Cancer,Hematological Disease,Organisma...	Neoplasia of blood cells	4,67E-04		1,494	↑ACADSB, ↑ACSL4, ↑AIG1, ...	78
Cancer,Organismal Injury and Abnormaliti...	Breast or colorectal cancer	7,10E-14		1,477	↑ABCD3, ↑ACAA1, ↑ACSL4, ...	163
Cancer,Organismal Injury and Abnormaliti...	Frequency of tumor	1,17E-19		1,451	↑A1BG, ↑AASDHPT, ↑ABCD3, ...	205
Cancer,Organismal Injury and Abnormaliti...	Pelvic tumor	1,92E-15		1,446	↑A1BG, ↑AASDHPT, ↑ACADSB, ...	181
Cancer,Organismal Injury and Abnormaliti...	Genital tumor	5,99E-14		1,446	↑A1BG, ↑AASDHPT, ↑ACADSB, ...	170
Cancer,Organismal Injury and Abnormaliti...	Extrapancratic malignant tumor	2,50E-26		1,419	↑A1BG, ↑AASDHPT, ↑ABCD3, ...	247
Cancer,Organismal Injury and Abnormaliti...	Intrathoracic malignant tumor	1,76E-03		1,408	↑AFM, ↑ALDH1B1, ↑ALOX5, ...	87
Cancer,Organismal Injury and Abnormaliti...	Malignant neoplasm of respiratory system	1,85E-03		1,408	↑A1BG, ↑AFM, ↑ALDH1B1, ...	94
Cancer,Hematological Disease,Organisma...	Hematologic cancer	4,20E-04		1,363	↑ACADSB, ↑ACSL4, ↑AIG1, ...	79
Cancer,Organismal Injury and Abnormaliti...	Abdominal neoplasm	1,77E-24		1,321	↑A1BG, ↑AASDHPT, ↑ABCD3, ...	241
Cancer,Organismal Injury and Abnormaliti...	Malignant genitourinary solid tumor	1,28E-15		1,309	↑A1BG, ↑AASDHPT, ↑ACAA1, ...	193
Cancer,Hematological Disease,Organisma...	Myeloid or lymphoid neoplasm	3,32E-04		1,276	↑ACADSB, ↑ACSL4, ↑AIG1, ...	80
Cancer,Organismal Injury and Abnormaliti...	Cancer of cells	9,72E-07		1,274	↑A1BG, ↑ACADSB, ↑ACSL4, ...	120
Cancer,Organismal Injury and Abnormaliti...	Tumorigenesis of epithelial neoplasm	7,57E-20		1,211	↑A1BG, ↑AASDHPT, ↑ABCD3, ...	204
Cancer,Organismal Injury and Abnormaliti...	Lung cancer	2,36E-03		1,192	↑AFM, ↑ALDH1B1, ↑ALOX5, ...	86
Cancer,Endocrine System Disorders,Organ...	Nonpituitary endocrine tumor	1,95E-21		1,191	↑A1BG, ↑AASDHPT, ↑ABCD3, ...	211
Cancer,Organismal Injury and Abnormaliti...	Breast or gastric cancer	3,52E-10		1,131	↑A1BG, ↑ACAA1, ↑AEBP1, ...	143
Cancer,Organismal Injury and Abnormaliti...	Lymphoreticular neoplasm	2,46E-04		1,055	↑ACADSB, ↑ACSL4, ↑ALOX5, ...	67
Cancer,Endocrine System Disorders,Organ...	Abdominal neuroendocrine tumor	1,12E-03		1,000	↑ACSL5, ↑ARID1A, ↑CD44, ...	27

→ En conclusion de cette troisième partie, l'exposition à l'alcool *in vivo* impacte fortement l'angiogenèse placentaire (par des voies parallèles à celle retrouvées dans le modèle murin)

→ La dérégulation de ces voies induit un risque de processus cancérogène des cellules.

Discussion

Malgré la tératogénicité de l'alcool, de plus en plus de femmes consomment de l'alcool de manière involontaire, de manière « festive », en dose unique ou encore de manière sporadique au cours de leur grossesse. Ces consommations entraînent un risque élevé de retards mentaux et neurocomportementaux chez les enfants à naître. Dans les cas les plus sévères, la conséquence est un syndrome d'alcoolisme fœtal (SAF) ; dans les cas d'expositions « occasionnelles » à l'alcool, il n'y a pas d'anomalie morphologique, néanmoins des défauts neuronaux, plus ou moins sévères, peuvent être observés et l'ensemble des atteintes neurologiques sont regroupées dans les Troubles Causés par l'Alcoolisme Fœtal (TCAF). Du fait de l'absence d'anomalies mesurables par un test direct à la naissance, le dépistage des TCAF est souvent tardif et difficile entraînant une prise en charge médico-sociale retardée de l'enfant. Puisqu'un enfant sur 100 naît en France avec un TCAF, l'identification de biomarqueurs devient une nécessité pour répondre à ce problème majeur de santé publique. Depuis une dizaine d'années, la recherche admet de plus en plus de rôles au placenta, longtemps considéré comme un simple filtre entre la mère et le fœtus. Cependant, alors que l'alcool atteint la circulation fœtale en passant par le placenta, très peu d'études se sont intéressées à l'impact réel de l'alcool sur cet organe aux multiples fonctions. De nombreuses études démontrent le rôle primordial du placenta dans le bon déroulement de la grossesse et quelques publications prouvent son rôle direct dans la mise en place du cerveau fœtal (Lecuyer et al. 2017, Rosenfeld et al. 2020). L'implication du placenta dans les mécanismes de toxicité de l'alcoolisation *in utero*, et sa facilité de récupération post accouchement, le place en première ligne dans la recherche de biomarqueurs d'alcoolisation prénatale. A cet égard, la question de la recherche de biomarqueurs d'atteinte placentaire devient, à son tour, pertinente.

Les objectifs de ce projet ont été de :

- Caractériser l'impact de l'alcool sur les fonctionnalités du placenta humain en décrivant le Syndrome d'Alcoolisation Placentaire (SAP),
- Comprendre les mécanismes sous-jacents à la neuro-placentologie, définie comme le rôle incontournable du placenta dans le développement cérébral du fœtus, et caractériser l'effet de l'alcool sur cet axe placenta-cerveau.
- Caractériser des biomarqueurs d'alcoolisation au cours de la grossesse et potentiellement comprendre comment ces altérations peuvent atteindre directement le développement du fœtus.

Cette discussion reprend les résultats en répondant au mieux à ces objectifs et en y apportant une analyse de la littérature ainsi que des perspectives d'études.

Avant tout, il est important de faire un point sur nos modèles expérimentaux et les conditions d'expérimentation choisies. Notre choix d'expérimentation *in vitro* a été une dose d'alcool, non répétée en cours de culture ou de l'incubation des explants, avec une dose correspondant à des expositions retrouvées *in vivo* dans le sang maternel. Les trophoblastes ou les villosités (issus de placentas « alcool » ou « contrôle ») ont été exposés à une dose unique d'alcool de 0.5g/L ou de 2g/L dans le milieu de culture pour un temps d'incubation de 24h à 72h.

Dans la littérature, il est décrit que l'alcool et son métabolite, l'acétaldéhyde, atteignent et traversent aisément le placenta. La concentration d'alcool dans le sang fœtal atteint celle de la mère 1 à 2h après l'absorption de l'alcool (Idanpaan-Heikkila et al. 1972). Très tôt également, les chercheurs ont démontré la capacité de l'acétaldéhyde maternel à traverser le placenta pour se retrouver dans la circulation fœtale (Espinat and Argiles. 1984) ; cependant, alors que la concentration d'alcool maternelle est égale à la concentration fœtale, la concentration d'acétaldéhyde est plus faible chez le fœtus. De plus, plusieurs études ont prouvé que le placenta et le fœtus avaient chacun une très faible capacité de métabolisation de l'alcool du fait de la très faible quantité d'ADH placentaire et de l'immaturation du foie fœtal (Pikkarainen and Rahia. 1967, Pikkarainen 1971, Sanchis and Guerri. 1986). Afin de déterminer les effets de l'alcool et de l'acétaldéhyde sur le placenta humain, nous avons regardé les effets de l'un et l'autre *in vitro* sur un modèle de trophoblastes en culture. Pour des trophoblastes exposés uniquement à l'alcool *in vitro*, seuls quelques effets ont été observés et la plupart n'étaient pas significatifs. Le choix des doses peut être une explication par rapport à nos conditions de culture. Effectivement, si l'on s'intéresse aux résultats de l'exposition des trophoblastes à l'alcool *in vitro* dans la littérature, il est remarquable de noter que les doses d'alcool sont bien plus fortes et surtout en doses répétées sur les temps d'incubation. Pour exemple, nous pouvons citer l'étude de Karl et al. en 1993 avec une exposition des trophoblastes en culture, répétée chaque jour, pendant 4 jours à une dose élevée de 7g/L d'alcool, ou encore l'étude de Kalisch-Smith et al. en 2016 avec une exposition renouvelée tous les deux jours des trophoblastes murins à un milieu de culture supplémenté avec 2g/L ou 10g/L d'EtOH pendant 6 jours engendrant une toxicité directe avec une diminution de la survie

cellulaire. Ces différences de traitement pourraient expliquer, en partie, le peu d'effets obtenus avec l'exposition à l'alcool *in vitro* uniquement, dans nos modèles de culture de trophoblastes et d'explants villositaires.

Concernant l'acétaldéhyde, nous avons regardé l'effet de différentes doses (faible [0.5µM] à très forte ([50µM] d'acétaldéhyde) sur le modèle de cultures de trophoblastes. L'acétaldéhyde, quelle que soit la dose, n'a pas d'effet sur le trophoblaste *in vitro*.

De manière globale, alors que très peu d'effets significatifs ont été détectés par l'exposition à l'alcool *in vitro*, les effets de l'alcool *in vivo* ont été majeurs dans notre étude. Nous nous sommes alors posé la question des raisons d'une détection de ces effets avec une consommation *in vivo* par rapport à l'absence d'effets *in vitro*. Cela était d'autant plus surprenant que le contexte de chaque femme ayant consommé de l'alcool est forcément différent. Evidemment, il faut considérer la femme enceinte dans un « environnement complexe » où une multitude de facteurs peuvent interférer avec la consommation d'alcool. Parmi les critères à prendre en compte en termes d'effets *in vivo*, il est indispensable de considérer la « fenêtre » de consommation de l'alcool, ayant des conséquences différentes sur les périodes de développement. Une consommation excessive sur les premiers jours après la fécondation induit la loi du tout ou rien. Trop tôt, au moment de l'implantation, la toxicité de l'alcool peut causer la mort de l'embryon et être responsable de fausses couches (Sundermann et al. 2019). De la même manière, il est bien connu que l'alcool a des effets majeurs sur la période embryonnaire avec une sensibilité maximale de l'embryon aux effets tératogènes. Quoi qu'il en soit, les molécules même les plus tératogènes avec une exposition la plus dangereuse ne provoquent jamais 100% de malformations. De fait, comment s'assurer des effets de ces molécules, en dehors de la tératogénicité ?

La question de l'impact de l'alcool dans le temps, bien qu'étudiée dans les modèles animaux, pose un problème éthique chez l'humain. De fait, la mise au point d'un modèle de trophoblastes humains à différents termes en culture 3D (organoïdes) avec une exposition à l'alcool *in vitro* en dose répétée (dans un environnement contrôlé) pourrait permettre de vérifier les voies de signalisation de l'alcool pour observer comment se déroulent les altérations d'un point de vue chronologique. Ces analyses permettraient de décrypter l'effet dose, l'effet temps et d'appréhender les effets de l'alcool observés *in vivo*.

Au regard des résultats obtenus avec l'exposition *in vitro* seule (alcool ou acétaldéhyde), nous avons privilégié de focaliser la discussion des résultats sur les effets d'une consommation d'alcool *in vivo* (sans connaissance réelle de la consommation d'alcool et du pourcentage d'éthanol ou d'acétaldéhyde réellement en contact avec le placenta). De manière très surprenante, tous les prélèvements exposés à l'alcool *in vivo*, bien qu'ayant été exposés très différemment (consommation très différente entre les femmes) présentaient tous des effets significatifs de l'alcool. Alors même que certaines avaient consommé de l'alcool précocement et avaient cessé de consommer rapidement au début de la grossesse, les résultats ne différaient pas significativement entre les prélèvements issus des différents types de consommation. De manière encore plus étonnante, les prélèvements ayant été déjà exposés à l'alcool *in vivo* avaient parfois une réponse à l'alcool *in vitro* témoignant d'une synergie dans la réexposition à l'alcool. Ces résultats ont été observés quel que soit le délai entre l'exposition *in vivo* et l'exposition des trophoblastes *in vitro*, obtenus après accouchement (nous reviendrons sur ces effets potentialisés plus tard dans la discussion). Ainsi, la discussion a été basée sur les effets de la consommation d'alcool *in vivo* des femmes au cours de leur grossesse en comparaison avec des femmes n'ayant rien consommé d'après leur déclaration. Seuls les effets de l'exposition à l'alcool *in vitro* ont été discutés, majoritairement dans le cadre d'une surexposition des prélèvements déjà exposés *in vivo*.

Dans un premier temps, cette étude a permis d'identifier l'impact fonctionnel de l'alcool *in vivo* sur le placenta et ainsi de caractériser le Syndrome d'Alcoolisme Placentaire (SAP). De nombreuses fonctions placentaires essentielles au bon développement du fœtus ont été altérées significativement par l'alcool *in vivo*, notamment les fonctions endocrines, métaboliques et de transport.

La fonction endocrine est primordiale pour le maintien de la grossesse et la croissance fœtale. Nous avons noté que la sécrétion de l'hCG, communément appelée « l'hormone de grossesse » est fortement augmentée par la consommation d'alcool dans nos modèles de trophoblastes en culture et d'explants villositaires. C'est la première molécule sécrétée par le blastocyste lors de son implantation. Son importance tout au long de la grossesse a été largement étudiée et sa dérégulation est attribuée à différents facteurs exogènes et à certaines pathologies de grossesse. L'hCG possède plusieurs glycoformes et les altérations des niveaux de taux circulants sont retrouvés dans des complications de grossesse comme la prééclampsie (Sirikunalai et al. 2015) mais aussi les fausses couches et les anomalies chromosomiques fœtales (Wald et al. 2000, Paulomaki et al. 2007, Sirikunalai et al. 2015). Dans une revue de 2015, Stevens et al ont pu recenser les preuves du rôle de l'augmentation pathologique du taux circulant d'hCG β dans le diagnostic et la prévention des pathologies trophoblastiques gestationnelles (regroupant les tumeurs bénignes et maligne de la grossesse) (Stevens et al. 2015). Produite majoritairement par le syncytium, l'augmentation très significative de la sécrétion d'hCG observée par l'exposition à l'alcool *in vivo* n'est pourtant pas en corrélation avec une augmentation de la fusion des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblastes. A l'inverse même, l'exposition à l'alcool *in vivo* diminue très significativement la fusion *in vitro* des CTV en ST en culture primaire. Dans la temporalité, nous avons observé une diminution significative de la fusion dès 24h de culture alors que l'augmentation de l'hCG n'est significative qu'à partir de 48h. Cette étonnante découverte donne lieu à plusieurs hypothèses qui peuvent converger vers une même explication.

La première hypothèse est celle de l'activation de la signalisation de GCM1, facteur de transcription impliqué dans le processus de fusion des cytotrophoblastes, par la fixation de l'hCG à son récepteur LHCGR (Cheong et al. 2016). En effet, ce facteur de transcription est connu pour contrôler la transcription de la syncytine 2 (Liang et al, 2010). L'analyse du protéome a montré une augmentation très nette de l'expression de GCM1 dans les

placentas « Alcool ». Ce résultat reste à être confirmé par Western Blot. Par ailleurs, GCM1, en étant activé, va être transloqué au noyau et produire à son tour de l'hCG β et hCG α allant ainsi avoir un rétrocontrôle positif sur la production d'hCG totale par les CTV (Cheong et al. 2016).

Une deuxième hypothèse, qui peut aisément rejoindre la première est celle de la non-maturité du trophoblaste exposé à l'alcool si nous le comparons avec un trophoblaste « contrôle ». En effet, il est possible que l'exposition précoce à l'alcool du trophoblaste au cours de la grossesse l'empêche de se « développer » correctement et d'acquérir le phénotype d'un trophoblaste à terme. Cette hypothèse, est tout d'abord soutenue par l'analyse en composante principale des profils protéiques des 4 groupes (« contrôle », « alcool » termes et 1^{er} trimestre « précoce » et « tardif ») effectuée à l'aveugle, montrant que la deuxième répartition la plus significative des protéines regroupe les prélèvements issus d'IVG précoces avec ceux issus de placentas à terme exposés à l'alcool *in vivo* d'un côté, et les prélèvements issus de placentas à terme « contrôle » associés aux prélèvements issus d'IVG tardive de l'autre. La masse cytotrophoblastique au 1^e trimestre de grossesse ayant un agencement particulier, il serait intéressant d'aller regarder en microscopie électronique des coupes de villosités issues de placentas, exposés à l'alcool *in vivo*, afin de vérifier la structure macroscopique des couches trophoblastiques et syncytiales.

Que ce soit en termes d'analyses du protéome, d'analyses des transcrits de gènes d'intérêt ou de la sécrétion de l'hCG, les résultats ont mis en avant la similarité entre les prélèvements d'IVG précoces et les prélèvements exposés à l'alcool *in vivo*. Le lien entre ces deux groupes a été mis en évidence tout au long des résultats et concerne tous les placentas sans distinction. Cependant il est tout de même important de rappeler que nous n'avons pas la notion d'alcoolisation *in vivo* des prélèvements du 1^{er} trimestre. Bien que nous ayons retiré le biais du tabac nous ne pouvons pas affirmer que les prélèvements de 1^{er} trimestre (que ce soient les IVG précoces ou les IVG tardives) n'ont pas été exposés à l'alcool *in vivo*. Malgré tout, si ce postulat était l'unique raison, les deux groupes issus d'IVG de premier trimestre devraient être regroupés avec les placentas à terme exposés à l'alcool. Or si l'on regarde le PCA des 4 groupes d'échantillons du protéome, il y a une différence significative entre le protéome du 1^e trimestre précoce et celui du 1^e trimestre tardif. Le fait que le logiciel d'analyse regroupe à l'aveugle les prélèvements de 1^{er}

trimestre précoces avec les prélèvements « alcool » ne semble donc pas dû uniquement à une possible exposition précoce à l'alcool des placentas issus d'IVG. De plus, au vu des profils très différents des six prélèvements exposés à l'alcool *in vivo*, il est intéressant de noter que les résultats ne diffèrent pas entre eux. Deux d'entre eux issus de femmes ayant consommé de l'alcool de façon précoce et occasionnelle en tout début de grossesse montrent le même profil hormonal, génique et protéique, que les trois prélèvements de femmes ayant consommé de manière prolongée et plus excessive tout au long de la grossesse. Cela suggère que l'alcool a un réel impact sur le placenta à terme, quelle que soit la consommation antérieure. En ce sens, il est possible de dire qu'une consommation en début de grossesse aurait un impact définitif sur le placenta tout au long de la grossesse. Ce fait, déconcertant, témoigne de la « mémoire » du placenta face à la prise d'alcool et de l'importance de prendre en compte la mesure de l'hCG dans le cadre d'une exposition à l'alcool.

Une étude de Lehtikoinen et al. a permis de montrer, sur une cohorte de 544 femmes (dont 71 avaient consommé de l'alcool et/ou des drogues) que la consommation d'alcool et/ou de drogues au cours de la grossesse était associée à une augmentation significative du taux circulant de l'hCG β au 1er trimestre de grossesse en comparaison avec des patientes contrôles. Cependant les auteurs ont conclu à un recouvrement de 42% des patientes consommant de l'alcool avec des patientes étant exposées également au tabac et ont déterminé que le tabac était la cause principale de cette augmentation. A notre connaissance, aucun dosage d'hCG à terme n'a été effectué sur des cohortes de patientes ayant consommé de l'alcool. Concernant notre étude, deux des six femmes ayant consommé de l'alcool ont déclaré qu'elles n'avaient pas fumé (aucune information de ce type pour les quatre autres femmes de ce groupe), ni consommé d'autres substances que l'alcool au cours de leur grossesse. Or, il s'avère que les cultures de trophoblastes issus de ces deux placentas avaient des taux d'hCG sécrétés équivalents aux cultures de trophoblastes issues des quatre autres placentas du groupe « alcool ». De fait, le facteur tabac ne peut être retenu pour notre étude. Ainsi, si ce biomarqueur était utilisé, il serait peut-être intéressant et judicieux d'ajouter un critère d'exclusion « tabac » pour s'assurer de la pertinence du biomarqueurs hCG. Une de leurs observations portait sur le poids du placenta de patientes ayant consommé de l'alcool. Nous savons que ce paramètre est de plus en plus important et qu'il faut le considérer en prenant en compte également le poids du bébé à la naissance. Ainsi, le rapport fœto-placentaire (poids du fœtus/poids du

placenta) est un critère d'efficacité placentaire au cours de la grossesse. Dans l'étude de Lehtikainen et al (2020), les auteurs ont montré que les placentas de femmes ayant consommé de l'alcool étaient plus gros que les placentas contrôles. Nous ne retrouvons pas ces résultats avec les six placentas recueillis et nous n'avons aucune différence significative de poids des placentas « alcool » en comparaison avec les placentas « contrôles ». De la même manière le ratio poids du bébé/poids du placenta ne diffère pas significativement entre l'échantillon « contrôle » et l'échantillon « alcool ».

L'étude de Karl et al. en 1993 a montré sur un modèle de culture de trophoblastes humains à terme que les taux d'hCG et de progestérone sécrétés étaient significativement augmentés par l'exposition *in vitro* à 7.7g/L d'éthanol pendant 4 jours, avec un renouvellement du milieu contenant de l'alcool toutes les 24h, et ce en comparaison avec des cellules issues des mêmes prélèvements et exposées à un milieu de culture contrôle (sans éthanol et renouvelé également toutes les 24h). Dans le cadre de notre étude, nous observons des variations de sécrétion d'hCG entre les deux groupes mais aucune variation sur les taux de progestérone. Les différences majeures entre ces deux études sont le traitement et le type d'exposition (*in vitro* avec doses fortes répétées vs *in vivo* sans aucune dose ou avec une dose unique). Le fait que la progestérone sécrétée en culture ne diffère pas entre les placentas exposés *in vivo* à l'alcool et les placentas contrôles, alors que la sécrétion d'hCG est très différente peut s'expliquer par le fait que les voies de signalisation sont différentes mais aussi, pourrait témoigner de systèmes de compensation. La progestérone étant une hormone stéroïde, elle est produite par stéroïdogénèse et est donc dépendante de la voie du cholestérol (Azeez et al. 2021). Également elle est dépendante de la voie ERK/MAPK et de la sécrétion de l'hCG qui a un contrôle positif sur sa sécrétion. Lorsqu'elle est surexprimée, la progestérone a un rôle dans les cancers du sein et l'augmentation des risques de diabète gestationnel (Azeez et al. 2021). Au vu de l'augmentation significative de la sécrétion d'hCG ainsi que l'activation de la voie de signalisation de cancer du sein, nous pourrions nous attendre à observer une forte augmentation de la synthèse et de la sécrétion de la progestérone. Cela n'étant pas le cas, nous émettons l'hypothèse d'un rétrocontrôle négatif de sa sécrétion par une autre voie. Les protéines impliquées dans une voie du métabolisme du cholestérol étant significativement diminuée, il est possible que la production de progestérone par cette voie soit ralentie. Par ailleurs, il est nécessaire de distinguer l'activation des voies de signalisation par phosphorylation/déphosphorylation et de suivre les protéines

impliquées selon leur état phosphorylé ou non. Cela pourrait également expliquer la différence observée entre un effet *in vivo* et un effet *in vitro*.

L'hCG permet l'augmentation de la sécrétion de PG par les syncytiotrophoblastes ; or la fusion des CTVs est significativement diminuée de façon précoce par l'alcool *in vivo*, ce qui pourrait expliquer ce décalage dans la sécrétion. Un dosage de progestérone intracellulaire pourrait confirmer cette hypothèse. Cela nous amène à reprendre la temporalité des événements. Le déficit de fusion est significativement diminué dès 24h de culture. La diminution très significative de la fusion des CTV en ST et ce, dès 24h de culture, est étonnante au vu de l'augmentation très significative de l'hCG par l'alcool *in vivo*. Il semble donc évident que l'alcool a un effet direct sur le CT.

La fusion étant principalement médiée par la sécrétion de l'hCG β et des molécules GCM1, SYNC1, SYNC2 et leurs récepteurs (ASCT2 et MFSD2), nous nous attendions à voir une forte augmentation des phénomènes de syncytialisation avec l'augmentation significative de l'expression protéique de GCM1 sur les villosités « alcool » et la sécrétion d'hCG en culture. Une autre voie faisant intervenir TBP2/BCRP et PPAR α décrite par Peng et al. (2021) pourrait expliquer les défauts de syncytialisation observés. En effet, l'environnement pauvre en oxygène de la villosité chorale au cours des premières semaines de grossesse induit la signalisation de cette voie TBP2/BCRP et PPAR α pour induire plus de syncytialisation en début de grossesse (Peng et al. 2020). Dans le cadre de notre étude la voie de signalisation de PPAR α , bien que non significativement diminuée ($1.5 < z\text{-score} > -1.5$), reste fortement altérée par l'alcool *in vivo* (p-valeur significative). Ainsi, il serait intéressant d'étudier les régulations géniques par PCR et protéiques par WB des syncytines et de leurs récepteurs sur les trophoblastes issus de placentas exposés à l'alcool *in vivo*. Cette observation de l'augmentation d'hCG associée à un défaut de syncytialisation avait déjà été observé dans le cadre de plusieurs études dans le laboratoire (impact de la drépanocytose sur les fonctions placentaires (Thèse de Doctorat du Dr Cordier) et impact du BaP *in vitro* impliquant la voie du récepteur aux Aryls Hydrocarbures (AhR) (Travaux de Master 2 de J. Dalmasso)). Il serait donc également intéressant d'observer l'effet de l'alcool *in vivo* sur cette voie AhR dont les rôles sont à la fois d'assurer une détoxification et également d'assurer une voie de signalisation de ligands endogènes comme les métabolites du tryptophane. Ainsi, nous pourrions

connaître le lien entre fusion des trophoblastes et voie AhR, notamment une étude des CYP et de la voie AMPc/PKA pourrait être une piste pour répondre à ces questionnements.

Concernant l'impact de l'alcool *in vivo* sur le phénomène de fusion, il est très intéressant de souligner que l'exposition à l'alcool *in vitro* sur des trophoblastes issus de placentas ayant été exposés à l'alcool *in vivo*, diminue encore un peu plus la fusion des trophoblastes. Ce mécanisme d'amplification confirme bien le fait que le placenta exposé de façon précoce *in vivo* garde une mémoire de cette exposition jusqu'au terme.

De fait, en lien avec cet effet mémoire, nous pensons à des modifications épigénétiques. Ces résultats prouvant une « mémoire du placenta » ont déjà été décrits dans un autre contexte par les travaux de Rousseaux et al (2020). Les auteurs ont montré pour la première fois que la consommation de tabac, même avant grossesse, pouvait entraîner des répercussions sur le placenta, en entraînant des modifications épigénétiques de l'ADN placentaire.

L'alcool est reconnu pour altérer les mécanismes agissant dans les processus menant à la méthylation de l'ADN. Les travaux menés par Legault et al. en 2021 sur des modèles animaux exposés à une forte dose d'alcool ont montré que 81 % des embryons ne présentaient aucun problème morphologique, tandis que 19 % avaient diverses anomalies (p. ex. : atteintes au cerveau, retard de croissance, cardiopathies). Cependant, lorsque les cerveaux d'embryons exposés à l'alcool *in vivo*, ne présentant pas de défauts physiques apparents, ont été analysés, les auteurs ont mis en évidence la présence d'une multitude de perturbations épigénétiques au niveau de la méthylation de l'ADN dans le cerveau. De plus, Lussier et son équipe, en 2018, ont pu mettre en évidence une signature épigénétique de l'alcool dans l'ADN provenant du frottement des muqueuses de personnes TCAF (entre 3.5ans et 18ans) par rapport à d'autres personnes n'ayant pas été détectées TCAF. Pour répondre à cette question de « mémoire » du placenta à l'alcoolisation *in vivo*, nous avons d'ores et déjà préparé des échantillons en vue d'une analyse des profils de méthylations de l'ADN des échantillons « alcool » issus de villosités entières en comparaison avec les échantillons « contrôles ». Cet axe de recherche est d'autant plus important dans le cadre de la recherche de biomarqueurs d'alcoolisation au cours de la grossesse que les méthylations à l'ADN sont stables dans le temps et pourraient être facilement analysées à la naissance.

Au regard de notre hypothèse sur la régulation des hormones stéroïdes, nous nous sommes posé la question de l'impact de l'alcool *in vivo* sur le métabolisme du cholestérol, sa régulation et l'impact de sa dérégulation sur le métabolisme lipidique.

Cette partie de la discussion, sur le métabolisme placentaire, sera donc centrée principalement sur le métabolisme lipidique avec l'étude de la voie de signalisation du cholestérol et la voie de signalisation PPAR α .

La voie de signalisation du récepteur aux oxystérols LXR (liver X receptors) associé au récepteur RXR (rétinoïde X receptors) permet la régulation de l'homéostasie du métabolisme du cholestérol. Lorsque le taux de cholestérol extracellulaire augmente, la voie LXR/RXR est activée et permet la lipogénèse à partir du cholestérol en surplus. L'activation de ce dimère protéique, permet une protection cellulaire *via* l'inhibition de l'inflammation médiée par NF κ B. De plus, le métabolisme du cholestérol au niveau placentaire est important et son internalisation indispensable pour la synthèse des stéroïdes. Nos résultats de protéomique ont mis en évidence une diminution très significative de la voie RXR/LXR lors d'une exposition à l'alcool *in vivo*.

Au vu de l'importance de cette voie dans l'homéostasie, nous pouvons nous poser la question de l'impact de cette diminution d'expression protéique au niveau du métabolisme lipidique, essentiel pour de nombreuses fonctionnalités du placenta. De manière générale, une dérégulation du métabolisme lipidique peut être pathologique et a été décrite dans différents cas, comme la maladie d'Alzheimer (Chia Kao et al. 2020) ou, en ce qui concerne plus particulièrement les pathologies de grossesses, de la prééclampsie (Wojcik-Baszko et al. 2018). Cependant, dans le cadre de notre étude, un biais pourrait expliquer en partie la dérégulation de cette voie spécifique. En effet, l'étude du protéome a été effectuée sur des villosités « contrôles » toutes issues de césariennes (sans déclenchement hormonal), en comparaison avec des villosités « alcool » issues de voies basses impliquant une mise en travail physiologique, avec les modulations hormonales et du système inflammatoire. Il est décrit qu'au moment de l'accouchement, une chute de la lipogénèse survient *via* l'inactivation de la voie LXR ayant pour impact une inflammation permettant la mise en route du travail (Thèse de Doctorat du Dr Mouzat, 2007). Les femmes « contrôles » n'ayant pas eu de mise en travail impliquant un changement physiologique, l'effet de l'alcool *in vivo* sur le processus lipidique et la voie LXR/RXR nécessite d'être validé sur des villosités issues de patientes « contrôles » ayant accouché

par voie basse après une mise en travail spontanée. De manière intéressante, l'expression protéique des transporteurs d'efflux lipidique (APOA1, APOA4, APOC1) est également diminuée significativement par l'alcool *in vivo*. A notre connaissance, ces transporteurs n'ont pas de rôle direct dans la mise en travail de l'accouchement. Si l'inactivation de la voie LXR/RXR n'était qu'un biais de l'étude, ces transporteurs n'auraient pas été nécessairement impactés par le processus. Nous pouvons donc supposer que l'effet sur la voie métabolique des lipides est bien dû à un effet de l'alcool *in vivo*. Afin de vérifier ces hypothèses, il serait intéressant de faire une analyse lipidomique qui nous permettrait d'analyser efficacement les variations d'expression de lipides, leurs voies de synthèse au niveau trophoblastique dans le cadre d'une alcoolisation *in utero*. Ainsi, cela nous permettrait de vérifier l'impact de l'alcool *via* la voie LXR/RXR sur le métabolisme lipidique.

Une autre voie impliquée dans le métabolisme lipidique est altérée par l'exposition à l'alcool *in vivo*. Il s'agit de la voie des PPARs, appartenant à la famille des récepteurs nucléaires qui se définissent comme des facteurs de transcription activés par un ligand. Identifiés dans les années 1990 dans la réponse aux proliférateurs de peroxyosomes, leurs rôles dans la régulation du métabolisme des lipides et des lipoprotéines, dans l'homéostasie du glucose ainsi que dans la différenciation cellulaire ont largement été démontrés. Il existe trois isoformes de récepteur PPAR (α , β et γ), chacun possède un rôle au sein de l'organisme humain. Notamment les PPARs associés au récepteur X des rétinoïdes RXR (α ou β) sont impliqués dans les processus biologiques tel que la différenciation cellulaire, l'homéostasie métabolique, la tolérance immunitaire et la réponse inflammatoire (Peng et al. 2021). Peng et al. en 2021 se sont intéressés à l'implication de ces récepteurs au niveau du développement placentaire et notamment au niveau des fonctions du tissu trophoblastique. Dans notre étude, suite à l'exposition à l'alcool *in vivo*, les analyses du protéome ont permis de mettre en évidence une altération significative de la voie PPAR α /RXR α (p-value = 4.94×10^{-2}) qui n'est toutefois pas significativement activée ou inhibée dans son ensemble. Dans la littérature, il est indiqué que dans un contexte de faible saturation en oxygène (comme le premier trimestre de grossesse par exemple), l'expression protéique de TBP-2 (TATA-binding protein 2) et BCRP (breast cancer resistance protein) est diminuée, ce qui induit l'inhibition de PPAR α empêchant la formation des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblastes (Peng et al. 2021, Francois et al. 2017). L'altération de cette voie par l'alcool *in vivo* pourrait donc être

une explication à la diminution de la fusion des cellules en culture issues de placentas exposés à l'alcool *in vivo*. Il serait intéressant de confirmer ou infirmer une inhibition de ces acteurs (TBP-2, BCRP et PPAR α) par l'alcool *in vivo* via une analyse par western blot.

De manière intéressante, cette voie PPAR α /RXR α est également impliquée dans le mécanisme de l'homéostasie lipidique cérébrale et sa protection au niveau de la barrière hémato-encéphalique (More et al. 2017).

Dans cette partie de la caractérisation du SAP, nous avons voulu caractériser pour la première fois l'impact de l'alcool *in vivo* sur l'expression génique d'un large panel de transporteurs du placenta à terme. Le modèle utilisé a été la villosité choriale dans son entier, en tenant compte des différents types cellulaires tels que le cytotrophoblaste, le syncytiotrophoblaste qui ont tous deux des rôles décisifs, notamment dans le passage transplacentaire, mais également le tissu mésenchymateux et les cellules de la paroi endothéliale des capillaires fœtaux qui jouent un rôle fondamental vis-à-vis de l'alcool.

Nous avons montré que l'expression protéique de 61 transporteurs placentaires (22 transporteurs SLC et 39 transporteurs autre que SLC) était altérée par l'alcool *in vivo* sur un modèle de villosités entières.

Parmi les transporteurs les plus dérégulés, nous avons retrouvé un transporteur essentiel, le SLC16A2 ou MCT8 qui est impliqué dans la régulation du passage des hormones thyroïdiennes. Par exemple, il est bien établi que pendant le premier trimestre de la grossesse, un apport adéquat d'hormones thyroïdiennes maternelles doit être maintenu pour assurer un développement neurologique normal du fœtus. En effet, les hormones thyroïdiennes fœtales sont capables d'accumuler de l'iodure et de synthétiser ces hormones qu'à partir de 12-14 SA (Glinioer. 1997). L'expression de SLC16A2 est essentielle pour l'absorption de T3 et fortement spécifique pour les hormones thyroïdiennes (Friesema et al. 2003).

Dans le cas des placentas « alcool » de notre étude, son expression est fortement diminuée, voire quasi inexistante à terme. Un déficit de ce transporteur peut conduire à une altération forte des taux circulants d'hormones thyroïdiennes dès le premier trimestre de grossesse. Différentes mutations inactivatrices/ altérations de ce transporteur sur modèles humains, murins et sur les lapins sont décrites dans la revue de Visser et al. (2011) entraînant des concentrations sériques anormales d'hormones thyroïdiennes et

un retard psychomoteur. De manière très intéressante, ce transporteur est présent à la fois dans le placenta et le cerveau fœtal (Visser et al. 2011). L'altération de son expression dans le placenta est associée à un RCIU sévère (Chan et al. 2014). Plusieurs études ont décrit le rôle essentiel de MCT8 et de l'hormone thyroïdienne T4 dans le développement cérébral fœtal (Delbaere et al. 2017, Chan et al. 2014, Williams 2008). Notamment, une dérégulation de MCT8 au niveau de la barrière hémato-cérébrale pouvait conduire à des déficits neuronaux (Roberts et al. 2008), un mauvais développement du QI, des difficultés de résolution de problème et des déficits psychomoteurs (Refetoff et al. 2020). Dans le cadre de notre étude de l'alcoolisation au cours de la grossesse, nous avons pu observer que la protéine MCT8 était exprimée uniquement par une villosité « alcool » (issue de la patiente AL4) en comparaison avec l'expression retrouvée dans les 5 villosités témoins à terme. De plus, la villosité issue de AL4 présentait tout de même un taux d'expression diminué significatif de MCT8. Ces résultats nous permettent de nous poser la question de l'impact de l'alcool sur le transport des hormones thyroïdiennes et le lien avec les défauts de développement cérébral induit par la consommation d'alcool chez les TCAF. De plus, au vu de l'absence de MCT8 pour quatre des cinq prélèvements, nous pouvons suspecter que les concentrations fœtales sont impactées. Notamment la thyroxine maternelle (T4) est essentielle pour le neurodéveloppement fœtal précoce. Des taux faibles de T4 au 1er trimestre de grossesse sont associés à des pathologies sévères tel que le crétinisme endémique, qui est un syndrome d'insuffisance thyroïdienne congénitale pouvant conduire à des retards mentaux sévères (Selon la classification Statistique Internationale des Maladies et des Problèmes de Santé Connexes, 2008). Au vu de cela il serait intéressant de mesurer les taux de T4 dans le sang de cordon des TCAF. Enfin la régulation des concentrations de T4 et T3 (tri-iodothyronine) dans la circulation fœto-placentaire est nécessaire à la réponse vasculaire du placenta (en régulant notamment la synthèse de vasodilatateurs ou vasoconstricteurs en fonction du besoin) (Guzmán-Gutiérrez et al. 2014).

Parmi les autres transporteurs SLC impactés, nous avons noté le cas des transporteurs de zinc. De manière globale, le zinc est reconnu comme étant impliqué dans la stimulation des défenses immunitaires et la protection contre le vieillissement cellulaire. Dans le cadre spécifique de la grossesse, le zinc est essentiel pour l'embryogenèse et la croissance normale du fœtus. Un déficit sévère en zinc dans la circulation fœtale peut avoir un effet tératogène (Hovdenak and Haram. 2012). Une étude de Thaker et al. (2018), sur une

cohorte de 277 femmes, a permis de mettre en évidence une carence significative en zinc chez des patientes ayant subi des fausses couches en comparaison avec des patientes témoins. Une relation directe entre ces carences maternelles et un déficit dans le transport du zinc pour le fœtus a été avancée. Le fait que l'expression protéique des transporteurs de zinc soit impactée significativement dans notre étude par l'exposition à l'alcool *in vivo* pourrait démontrer l'impact fonctionnel majeur de l'alcool sur le placenta. Cependant, nous pouvons mettre en évidence un système de compensation du placenta aux diverses altérations des transporteurs de zinc. Lorsque l'expression protéique de SLC30A1 est significativement diminuée par l'alcool *in vivo*, celle de SLC30A7 est augmentée significativement. Ces deux transporteurs de zinc transmembranaires issus de deux gènes paralogues, permettraient une compensation sans impact sur le passage du zinc de la mère vers le fœtus. Ces phénomènes de compensation sont déjà bien décrits pour d'autres classes de transporteurs (tels les ABC transporteurs protégeant le fœtus d'un grand nombre de toxiques) et témoignent d'une adaptation placentaire à un environnement hostile. Ces mécanismes, de manière plus globale, témoignent d'une protection du fœtus par le placenta afin de mener à terme la grossesse.

Le transporteur SLC26A2, était exprimé uniquement par une villosité « contrôle » (les autres villosités témoins ne l'exprimant pas) en comparaison avec l'expression significativement plus élevée des 5 villosités « alcool ». Ce transporteur de sulfate a été identifié comme étant exprimé majoritairement par les cytotrophoblastes et très peu par le syncytium (Simmons et al. 2013). Le fait que ce transporteur soit très fortement exprimé par les villosités exposées *in vivo* à l'alcool va de pair avec les résultats obtenus concernant à la fois la non-maturité que nous retrouvons au niveau des trophoblastes (même profil protéique des villosités de premier trimestre précoce) et au niveau du défaut de la syncytialisation retrouvée dans le modèle de culture primaire. Ces résultats suggèrent encore une fois que la masse syncytiale serait plus faible pour ces placentas « alcool » et inversement, le nombre de cytotrophoblastes pourrait être plus élevé dans ce même groupe en comparaison avec des placentas « contrôles ». Ce transporteur est également impliqué dans la mise en place du système osseux et cartilagineux du fœtus et sa dérégulation peut être impliquée dans la dysplasie fœtale (Härkönen et al. 2021 Monti et al. 2015, Haila et al. 2001).

Parmi les 22 transporteurs SLC dont l'expression est modifiée par l'alcool, quatre sont connus pour être exprimés largement au niveau cérébral. Leur variation d'expression est impliquée dans les mécanismes physiopathologiques de développement du cerveau : il s'agit de SLC19A3, SLC30A1 (déjà décrit), SLC9A3R1 et SLC29A1. De façon très intéressante, l'expression protéique de ces quatre transporteurs au niveau du placenta est diminuée par l'exposition à l'alcool *in vivo*.

Le transporteur SLC19A3 joue un rôle primordial dans le développement du SNC et le métabolisme en général. En effet, c'est un transporteur de thiamine (vitamine B1) qui code pour la protéine ThTR-2 permettant la régulation des taux de thiamine circulant en régulant l'absorption intestinale (Marcé-Grau et al. 2019). Nos résultats montrent une diminution significative de ce transporteur de thiamine au niveau du placenta qui pourrait suggérer un plus faible passage de thiamine de la circulation maternelle vers la circulation fœtale. Or une déficience en SLC19A3 a été étudiée dans différentes neuropathologies et glioses inflammatoires (Zahr et al. 2011, De la Monte and Krill. 2014, Marcé-Grau et al. 2019). Nos résultats montrent également une augmentation très significative du transporteur de thiamine SLC19A2 codant pour ThTR1. Cependant, il a été montré que le déficit en protéine ThTR1 n'affecte pas les taux circulants de thiamine plasmatiques au niveau intestinal (Marcé-Grau et al. 2019) et semble jouer un rôle moins important d'absorption de thiamine. Les défauts et/ou mutations inactivatrices de SLC19A2 sont impliqués dans des pathologies de type diabète ou TRMA (Anémie Mégalo-blastique Thiamine dépendante). L'augmentation très significative du transporteur SLC19A2 au niveau placentaire pour les placentas « alcool » pourrait avoir le même rôle de compensation déjà observé et permettrait cette fois-ci de compenser la diminution de SLC19A3 par l'alcool *in vivo* permettant de protéger le fœtus d'un défaut de thiamine. De manière très intéressante, plusieurs études rapportent une déficience en thiamine qui serait due à une consommation d'alcool et qui serait en corrélation avec une atteinte cérébrale (Zahr et al. 2011, De la Monte and Krill. 2014, Dervaux and Laqueille. 2016). De la même manière, les taux circulants de thiamine sont diminués et inversement corrélés avec l'alcool-dépendance chez des personnes alcooliques (Dervaux and Laqueille. 2016). A notre connaissance deux études se sont intéressées à ces transporteurs au niveau placentaire : celle de Eudy et al. en 2000 qui a permis la caractérisation de ce transporteur dans le placenta humain ; celle de Keating et al. en 2006 qui a caractérisé la capture de thiamine sur un modèle de lignée Bewo. Le transporteur

SLC19A3 pourrait donc être un bon candidat dans l'étude placentaire en étudiant tout d'abord le passage avec un modèle de perfusion en utilisant des placentas « alcool » et également dans son implication éventuelle, au niveau placentaire, dans les défauts neuronaux causés par l'alcool.

Le « transporteur » SLC9A3R1 (NHERF1) est une protéine chaperonne qui joue un rôle dans l'activité du transporteur SCL9A3 (échangeur sodium/proton) mais qui a également un rôle important dans la signalisation cellulaire. De plus, son expression est essentielle dans la régulation de PTEN. Une étude a démontré qu'un déficit en SLC9A3R1 était lié à une baisse d'expression de PTEN (Yang et al. 2011). Or, de manière très intéressante, l'expression de SLC9A3R1 est diminuée avec l'exposition à l'alcool *in vivo* et nous observons également une diminution de l'expression de PTEN dans le même contexte. On peut donc se demander si l'alcool diminue directement l'expression de PTEN ou si c'est la diminution d'expression de la protéine SLC9A3R1 qui est impactée par l'alcool, conduisant de facto à la diminution de l'expression de PTEN dans notre modèle de villosités placentaires exposées à l'alcool *in vivo*. Il a été montré que PTEN était impliqué dans la régulation des mécanismes de l'autophagie et que son activation par SLC9A3R1 couplée à Beclin1 permet d'activer l'autophagie dans un contexte de cancer du sein (Liu et al. 2015). De la même manière, SLC9A3R1 est impliqué dans la régulation de la prolifération des cellules du glioblastome *via* son action sur l'expression de PTEN dans la voie de signalisation PI3K/AkT (Molina et al. 2011). Enfin, l'augmentation de son expression est associée à la maladie d'Alzheimer (Tang et al. 2020). Tous ces éléments nous amènent à positionner cette protéine chaperonne comme un facteur de signalisation à prendre en considération pour l'étude des effets de l'alcool sur le placenta. L'association de ces PTEN et SLC9A3R1 peut donc être une piste pour la recherche de biomarqueurs d'atteintes placentaires par l'alcool.

Enfin, le transporteur SLC29A1 (ENT1) est un transporteur qui permet de maintenir l'équilibre de la composition en nucléosides entre deux compartiments donnés. Il a notamment une forte affinité à l'adénosine et est impliqué dans la régulation des taux d'adénosine extracellulaire lors d'une exposition à l'alcool (Choi et al. 2004). Il est intéressant de noter que l'adénosine joue un rôle majeur dans la vasodilatation. De fait, Nagy et al. en 1990 ont prouvé qu'une exposition aiguë à l'alcool (200mM (soit environs 36g/L) pendant 5 minutes) sur des cellules S49 lymphoïdes induisait une augmentation

du taux d'adénosine extracellulaire, *via* l'inhibition de SCL29A1, empêchant ainsi l'influx de l'adénosine dans la cellule. De manière surprenante, ils observaient un équilibre des taux d'adénosine revenu à la normale lors d'une exposition chronique (100mM pendant 48h), suggérant l'adaptation de la cellule à l'atteinte toxique. Ces phénomènes d'adaptation ont également été étudié dans le cadre de l'alcool-dépendance (Chen et al. 2010) et une proposition thérapeutique par ces mécanismes a été étudiée dans le contexte de la maladie de Huntington (Guitart et al. 2017). Enfin quelques études démontrent sa localisation dans le placenta humain (Errasti-Murugarren et al. 2017) et tout particulièrement son implication dans le passage de nombreuses drogues (Ceverny et al. 2018). Dans le cadre de notre étude, nous avons observé une diminution de l'expression de SLC29A1 qui n'est pas significative en termes de valeurs valides mais qui l'est en termes de variation d'expression (FC= (-1.98)). Cependant, au regard des phénomènes adaptatifs évoqués pour compenser les effets de l'alcool sur ce transporteur, on peut se demander si un mécanisme similaire existe au niveau de la villosité placentaire, ce qui serait primordial.

L'ensemble de ces résultats nous a permis de caractériser le syndrome d'alcoolisme placentaire composé d'altérations multiples par l'alcool *in vivo* de la fonction endocrine, la fonction métabolique et la fonction d'échanges et de transports. Ces trois fonctions essentielles au bon fonctionnement du placenta au cours de la grossesse ont forcément un impact sur le développement du fœtus, que ce soit au niveau de sa croissance ou au niveau de son bon développement. Au fil des résultats, nous pouvons aisément comprendre comment des défauts placentaires dû à une exposition à l'alcool pendant la grossesse pourraient avoir un effet direct sur le développement du cerveau fœtal et la mise en place du réseau cortical.

Dans ce second temps, nous avons donc exploré le champ de la neuroplacentologie décrit par Cheryl S. Rosenfeld en 2020 puis par Marie C. Vacher et al. en 2021. Nous avons souhaité apporter pour la première fois une cartographie d'expression génique d'un large panel de récepteurs neuronaux exprimés au niveau du placenta, et ce, tout au long de la grossesse (du premier au troisième trimestre de grossesse).

Le modèle utilisé a été la villosité chorale dans son entier, avec ses différents types cellulaires tels que le cytotrophoblaste, le syncytiotrophoblaste qui ont des rôles décisifs, notamment dans le passage transplacentaire, mais également le tissu mésenchymateux et les cellules de la paroi endothéliale des capillaires fœtaux qui jouent un rôle fondamental vis-à-vis de l'alcool. Cinq villosités issues d'IVG précoces, et cinq villosités issues de placenta ayant été exposées à l'alcool *in vivo* ont été comparées à cinq villosités « contrôles » issues de placentas non exposés à l'alcool à terme.

Une première surprise a été d'observer l'expression transcriptionnelle de 73 récepteurs de neuromédiateurs au niveau de la villosité placentaire. A notre connaissance, aucune étude de ce type n'avait été effectuée à ce jour. Classés en familles de neurotransmetteurs, nous avons pu mettre en évidence la présence de 21 sous familles comme les récepteurs à l'histamine, la sécrétine, la neurotensine, la somatostatine, la vasopressine etc. Il est bien connu que l'ensemble de ces récepteurs sont exprimés en périphérie sur de nombreux tissus/organes mais le placenta n'a jamais fait l'objet d'une cartographie complète. Parmi ces récepteurs, 26 sont exprimés différemment entre le début du premier trimestre de grossesse et la fin de la grossesse. C'est le cas de HCRT2, HRH1, HTR1B, HTRF1, HTR4, NPY5R, TACR1, TACR2, GRIA3, GRIK1, GRIK2, GRIK4, GRIN2C, GRM6, ADRA2A, ADRA2B, GABRA4, GABRB1, GABRE, GABRR2, CHRM1, CHRM4, CNR1, DRD1 dont l'expression au niveau de la villosité est plus faible au début de la grossesse qu'au terme de la grossesse. La mise en place du réseau cortical, chez l'humain, est un processus tardif au cours de la grossesse. De manière très intéressante, les 26 récepteurs aux neurotransmetteurs dont l'expression est augmentée physiologiquement en fin de grossesse au niveau placentaire, ont, pour certains, un rôle primordial dans le développement cérébral embryonnaire et fœtal. C'est le cas de GRIK2 (Guzman et al. 2012), ADRA2 α (Riccio et al. 2012), ADRA2 β (Wang et al. 2002, Winzer-Serhan & Leslie. 1997, Muthig et al. 2007), CNR1 (Sharkey et al. 2016) et DRD1 (Wang et al. 2020).

Puisque nous avons retrouvé l'expression de ces 73 récepteurs aux neurotransmetteurs au niveau du placenta humain, nous nous sommes posé la question de l'impact de l'alcool *in vivo* sur leur transcription. En comparant l'expression des ARNm de villosités issues de femmes ayant consommé de l'alcool en comparaison avec des femmes n'ayant pas été exposées (« contrôle »), nous avons pu mettre en évidence l'altération transcriptionnelle de treize de ces récepteurs par l'alcool *in vivo*. De manière très intéressante, sur les treize récepteurs aux neurotransmetteurs impactés par l'alcool *in vivo*, dix avaient une expression significativement diminuée par rapport aux villosités « contrôles », avec une expression d'ARNm semblable à celle des villosités que nous retrouvons au premier trimestre. Nous retrouvons ainsi de nouveau des similitudes de profils entre villosités « alcool » et villosités « IVG précoces ». Afin d'explorer l'intérêt d'une telle découverte dans la compréhension des mécanismes toxiques de l'alcoolisation *in utero*, nous avons comparé les résultats obtenus sur les treize récepteurs aux neurotransmetteurs impactés par l'alcool avec les données de la littérature. Parmi les treize, onze des récepteurs ont attiré notre attention. Il s'agit notamment de GRIA3 (Lo et al. 2016), GRIN2C (Kleiber et al. 2011), ADRA2 α (Clarke et al. 2010), GABRB1 (Halder et al. 2015), GABRB2 (Xuei et al. 2009), GABRG3 (Dick et al. 2004), GABARB3 (Krishnamoorthy et al. 2011), TACR1 (Nelson et al. 2017) et GRIK1 (Yang et al. 2017) qui sont tous associés à divers mécanismes d'alcool-dépendance, d'addiction et de troubles liés à la consommation d'alcool chez l'adulte et sont bien étudiés au niveau du cerveau humain ou murin. De la même manière l'altération de HTR4 (Faraone et al. 2010, Xu et al. 2013), GRIA3 (Tanaka et al. 2019), GRIN2C (Tarabeux et al. 2011), GABR1 (Vasquez et al. 2013), GABRG3 (Menold et al. 2001), GABARB3 (Li et al. 2012), CHRM1 (Marcé-Grau et al. 2021) est associée aux mécanismes impliqués dans le développement de troubles autistiques chez l'enfant ou chez l'adulte.

De manière particulièrement intéressante, cinq de ces récepteurs aux neurotransmetteurs pourraient être de très bons candidats pour la recherche de biomarqueurs placentaires d'atteintes neuronales. Il est largement décrit que les neurotransmetteurs adrénérgiques, glutamatergiques et GABAérgiques jouent un rôle essentiel dans la mise en place du réseau cortical (Herlenius and Lagercrantz. 2004, Poluch et al. 2002, Riccio et al. 2012). De plus, dans le contexte de l'étude du Dr Lecuyer en 2017 sur l'axe placenta-cerveau chez la souris, les auteurs ont étudié la désorganisation corticale fœtale du souriceau suite à une exposition à l'alcool *in utero*.

Partant de ce fait, et des observations faites sur les altérations des fonctions placentaires dans les échantillons « alcool », nous avons recherché quel(s) récepteur(s) aux neurotransmetteurs pourrai(en)t être candidat(s) et avoir un rôle clé dans l'atteinte cérébrale des enfants TCAF *via* leur dérégulation dans le placenta par l'alcool *in vivo*.

GRIN2C est une sous-unité des récepteurs NMDA. Les récepteurs NMDA, dont le nom provient de l'agoniste type spécifique, le N-méthyl-D-aspartate sont des récepteurs ionotropes activés par le glutamate et la glycine. Le rôle du glutamate est essentiel mais il peut potentiellement devenir dangereux en cas de dérégulation car il peut stimuler de manière excessive les neurones et par conséquent causer leur mort (selon un processus d'excitotoxicité, s'il est trop concentré et s'il persiste trop longtemps au niveau extracellulaire). Le glutamate est capté par le placenta à partir de la circulation fœtale, puis converti en glutamine avant d'être transporté dans la circulation fœtale, reflétant une coopération fœto-placentaire protectrice. En plus de ces échanges par transporteur, le récepteur au glutamate joue un rôle primordial dans le cerveau mais semble trouver un intérêt dans le placenta. Si les récepteurs-canaux du glutamate sont responsables de la transmission synaptique excitatrice rapide dans le cerveau, leur expression dans le placenta soulève de nombreuses questions. Deux études ont attiré notre attention. Notamment celle de Kleiber et al. en 2011, qui ont utilisé un modèle murin C57Bl/6J gestant et les ont exposées à 10g/L d'éthanol en consommation libre afin de créer un modèle de SAF. Ainsi, ils ont pu mettre en évidence une régulation négative de GRIN2C chez les fœtus qui était associée à une diminution du développement cortical à la naissance. De plus, une étude de Tarabeux et al. en 2011 a mis en évidence la dérégulation de GRIN2C dans le cadre du spectre de l'autisme et de la schizophrénie, prouvant ainsi le rôle essentiel de GRIN2C dans le développement cognitif du cerveau fœtal. Ces relations expression récepteur neuronal / expression récepteur placentaire sont possibles et déjà décrites dans la littérature. Par exemple, dans un autre contexte, il a été montré que des toxines, les Pinnatoxines, sont des ligands de haute affinité des récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (nAChR). Des études chez la souris ont montré des effets toxiques aigus pouvant conduire au décès en cas d'ingestion à forte dose ou pour des doses subléthales, les symptômes observés sont réversibles et compatibles avec une altération des fonctions du réseau cholinergique central et périphérique, induisant une paralysie musculaire et une détresse respiratoire. Cette toxine traverse les membranes et sa capacité à traverser

la barrière placentaire a également été montrée sur le modèle de perfusion du cotylédon humain *ex vivo* (Servent et al. 2021).

Le neurotransmetteur ADRA2 α est un récepteur adrénérgique. Il a été mis en évidence dans les mécanismes d'alcoolodépendance et de troubles liés à la consommation d'alcool chez l'adulte par Clarke et al. en 2010. De fait, en étudiant les altérations de ce récepteur chez 85 patients adultes dépendants de l'alcool en comparaison avec 1237 témoins, les auteurs ont mis en évidence deux polymorphismes de ADRA2 α chez les personnes alcoolodépendantes. De manière intéressante, l'expression transcriptionnelle de ce récepteur au niveau placentaire dans notre étude est diminuée significativement par l'alcool *in vivo*. Or l'étude de Riccio et al. en 2012 a pu mettre en évidence son rôle primordial au niveau de la mise en place du cerveau cortical et notamment de la migration des interneurons sur un modèle murin.

Enfin, plusieurs neurotransmetteurs GABAergiques sont particulièrement intéressants à explorer. Tout d'abord, une étude de Bekdash et Harrison en 2015 a mis en évidence une diminution significative de l'expression d'ARNm de GABRA4 suite à une exposition à l'alcool de cellules neuro-corticales murines. Les résultats de cette étude ont permis de mettre en évidence le rôle de GABRA4 dans l'abus d'alcool et les mécanismes de toxicité de l'alcool au niveau du cerveau. Une étude de Riley et al. en 2020 a permis de mettre en évidence le rôle de GABRA4 dans les troubles liés au spectre autistique. Cependant, ce résultat est controversé puisqu'une étude de Yalçintepe et al., en 2021, a démontré qu'il n'existait pas de lien entre les troubles autistiques et ce récepteur. Dans le cadre de notre étude, quatre sur cinq des villosités « alcool » présentent une diminution significative de la transcription de ce récepteur par rapport aux villosités « contrôles ». Une étude de l'expression protéique pourrait donc être intéressante pour affirmer ou infirmer le rôle de GABRA4 dans l'alcoolisation placentaire.

Un autre récepteur GABAergique est particulièrement intéressant dans le cadre de l'alcoolisation *in utero* puisque son expression transcriptionnelle dans la villosité est diminuée significativement par l'alcool *in vivo* : GABRB1. Une étude de Halder et al. en 2015 a mis en évidence son rôle dans les mécanismes des TCAF au niveau cérébral. En ajoutant de manière chronique de l'éthanol à 9g/L sur des cellules en culture issues d'une lignée cellulaire cérébrale humaine, les auteurs ont mis en évidence la diminution de l'expression de GABRB1. Par un croisement de la littérature *via* le logiciel GeneGO, ils ont

pu ainsi proposer le fait que le récepteur aux neurotransmetteurs GABRB1 pourrait interférer dans les mécanismes de toxicité de l'alcool au niveau du cerveau fœtal des TCAF. De plus, une étude de Vasquez et al. en 2013 a permis de mettre en évidence que les troubles autistiques étaient liés à la dérégulation négative de l'expression protéique de GABRB1 au niveau cérébral. De nouveau, nous avons un impact identique entre dérégulation cérébrale et dérégulation placentaire sous l'effet de l'alcool.

Enfin le neurorécepteur GABAR3 a été étudié dans le cadre des TCAF en 2011 par Krishnamoorthy et al. Ces derniers ont montré, dans un modèle de cellules germinales embryonnaires, que son expression était augmentée par l'exposition à l'alcool puis son diminuée 8h après l'exposition, témoignant d'un mécanisme inflammatoire. En 2012, une revue de littérature de Li et al. a mis en évidence le lien entre les altérations de ce récepteur aux neurotransmetteurs et les troubles autistiques. Nos résultats mettent en évidence une diminution significative de la transcription de GABAR3 dans les villosités exposées à l'alcool *in vivo* et sont corrélés avec la littérature. Ce qui nous permet de nous poser la question du rôle de l'expression de ce récepteur placentaire dans les TCAF.

En conclusion, nous avons mis en évidence la présence de nombreux récepteurs aux neurotransmetteurs dans le placenta humain qui sont impliqués directement dans les processus de développement cérébral de l'embryon et du fœtus. Le placenta, sans être un organe innervé, exprime de nombreux récepteurs aux neurotransmetteurs et capte également de très nombreux neuromédiateurs tel que le glutamate. Les résultats obtenus sont prometteurs pour remettre en avant le lien entre le placenta et le développement du cerveau fœtal. Des expériences de transport ou de blocage des récepteurs pourraient être menées pour mieux appréhender le rôle de chacun des récepteurs dont l'expression est modulée par l'alcool *in vivo*. De plus, il serait particulièrement intéressant d'explorer de façon spécifique l'expression de ces récepteurs au niveau trophoblastique dans un contexte d'alcoolisation *in utero* chez la femme enceinte.

L'ensemble de ces résultats, que ce soit au niveau du syndrome d'alcoolisme fœtal ou au niveau de la neuroplacentologie nous ont permis de faire un état des lieux global des effets de l'alcool sur le placenta et le rôle potentiel que le placenta peut avoir dans les troubles causés par l'alcoolisme fœtal.

Dans un troisième temps, afin de répondre à l'objectif final de cette étude avec la caractérisation de biomarqueurs placentaires d'alcoolisation au cours de la grossesse, nous proposons de résumer les effets observés discutés auparavant permettant de faire émerger des candidats potentiels. Puis, nous nous intéresserons tout particulièrement à l'impact de l'alcool sur l'angiogenèse qui est importante dans les mécanismes d'atteintes cérébrales. Nous proposerons un mécanisme possible d'altération de l'angiogenèse placentaire par l'alcool ainsi qu'une série de biomarqueurs placentaires potentiels d'alcoolisation *in utero*. Enfin, nous ouvrirons la discussion sur la relation inflammation/cancer avec le cas spécifique de l'impact de l'alcoolisation *in utero* sur l'augmentation des risques de développer un cancer.

Comme nous venons de le décrire, l'étude des récepteurs au niveau placentaire (appartenant aux trois familles des récepteurs glutamatergiques, des récepteurs GABAergiques et des récepteurs adrénérgiques) GRIN2C, ADRA2 α , GABRA4, GABRB1, GABARB3, au vu de leurs rôles dans les mécanismes de développements neuronaux et l'impact de leur dérégulation dans les pathologies d'addiction/dépendance à l'alcool ainsi que dans les troubles du spectre autistique (parfois associés aux TCAF), devient une nécessité. Du fait de leur présence dans la villosité chorale, ces récepteurs de neuromédiateurs essentiels deviennent des candidats incontournables dans la recherche de biomarqueurs placentaires de TCAF. Un focus sur certains des neurotransmetteurs de ces récepteurs serait pertinent, avec le rôle du glutamate par exemple, plaque tournante entre métabolisme énergétique, transport et signalisation.

Nous avons mis en évidence l'existence d'un syndrome d'alcoolisme placentaire caractérisé par des atteintes fonctionnelles multiples. Parmi les altérations de l'alcool, nous avons relevé les atteintes placentaires avec l'altération du métabolisme lipidique, l'altération d'expressions de transporteurs essentiels au bon fonctionnement du placenta et au maintien de la grossesse, et enfin un impact de l'alcool sur la fonction endocrine.

De fait, nos résultats ont permis l'émergence de l'hCG comme biomarqueur d'atteinte placentaire de l'exposition à l'alcool au cours de la grossesse. L'impact très important de l'alcool sur sa sécrétion nous amène à proposer la mesure d'hCG comme étant un biomarqueur potentiel intéressant à prendre en compte pour le diagnostic des TCAF. L'intérêt d'utiliser l'hCG concerne en grande partie sa facilité d'analyse. En effet, il serait aisé et très intéressant de refaire une étude de cohorte, comme celle de Lehtikoinen et al.

en 2020, en retirant le biais du tabac, et en dosant à la fois l'hCG totale et la chaîne β libre de l'hCG dans la circulation maternelle et en ajoutant la mesure de l'hCG totale dans le sang de cordon à la naissance. Cela pourrait permettre de déterminer si l'altération du rapport hCG materno-fœtal est équivalent entre femmes ayant consommé de l'alcool ou non pendant la grossesse et également de détecter des différences de la chaîne β libre de l'hCG comme cela a été montré pour plusieurs dépistages comme la trisomie 21 (Brun et al. 2014). De plus le rôle essentiel de l'hCG dans l'angiogenèse placentaire (Fournier, Guibourdenche and Evain-Brion. 2015, Jing et al. 2021) nous permet d'introduire notre deuxième sous partie.

Dans la partie « caractérisation de biomarqueurs placentaires d'alcoolisation *in vivo* » des résultats de ce manuscrit, nous nous sommes focalisés sur deux voies potentielles de l'angiogenèse : celle de la fixation de l'hCG sur son récepteur hCG/LHR et celle impliquant la régulation de PI3K/AKT/mTOR.

Un schéma final de l'impact de l'alcool sur les voies de signalisation de l'angiogenèse regroupant les principaux biomarqueurs placentaires potentiels de l'alcoolisation *in utero* a été représenté dans la Figure 54.

Trois voies interconnectées de l'angiogenèse semblent impactées significativement par l'alcool. La première est la voie de l'hCG qui est très significativement up-régulée par l'alcool *in vivo*. L'hCG en se fixant sur son récepteur va permettre la phosphorylation de la sous-unité Gs intra-cellulaire, permet l'induction d'une augmentation de l'expression de GCM1 *via* l'activation de la voie de signalisation des PI3K pro angiogénique. GCM1, surexprimée par l'alcool *in vivo*, pourrait ainsi être transloquée dans le noyau et se fixer à un promoteur GBS1/AP2 afin de produire de l'hCG en plus grande quantité. L'hCG une fois libérée dans le cytoplasme pourrait avoir un effet de rétrocontrôle positif sur sa propre sécrétion par les cellules trophoblastiques (Cheong et al. 2016). Dans le cadre de notre étude, l'analyse hormonale a mis en évidence une augmentation très significative de l'hCG, peu importe le modèle étudié, en présence d'alcool, associé à une diminution très significative de la fusion des trophoblastes, prouvant ainsi que l'augmentation de la sécrétion d'hCG n'est du fait de la formation des syncytiotrophoblastes. En utilisant le modèle de villosité entière, nous avons pu mettre en évidence une augmentation très significative de l'expression protéique de GCM1 par l'exposition à l'alcool *in vivo*. Il est donc possible d'émettre l'hypothèse que l'alcool agit sur la voie AMPc/PKA induisant ainsi

une boucle de contrôle positive non régulée de la sécrétion d'hCG *via* l'augmentation de la production de GCM1. Cette voie pourrait donc être une cible à explorer pour les troubles causés par l'alcoolisme foetal.

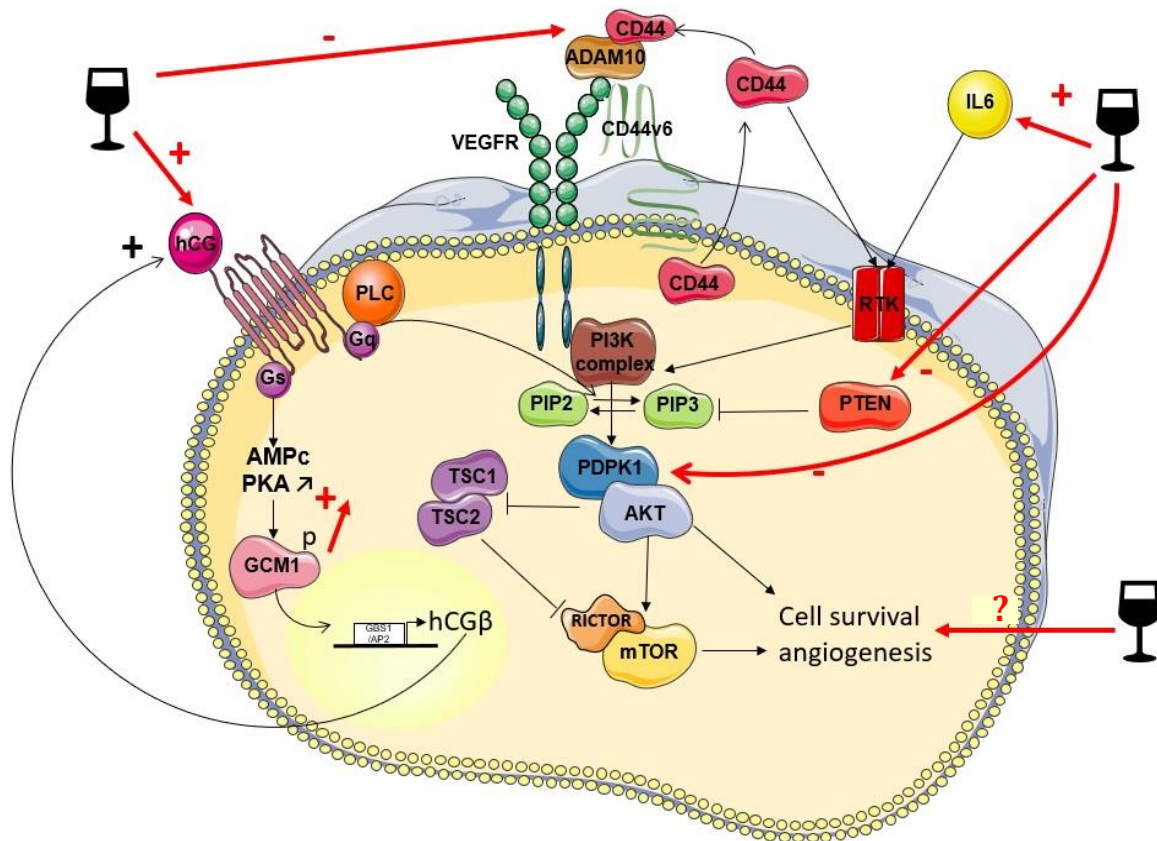


Figure 54 Impact of alcohol on placental angiogenesis pathway. Regarding all our result, we indicated all the significant alterations of actor from angiogenesis pathway by *in vivo* alcohol.

En se fixant sur son récepteur, l'hCG pourrait également permettre l'activation du dimère protéique Gq/PLC, induisant un effet activateur sur la voie PI3K/AKT/mTOR (Paniappan et al. 2010, Makker et al. 2012). Si notre hypothèse de la boucle de régulation positive de l'hCG sur sa propre sécrétion *via* son récepteur hCG/LHR se confirme, nous pouvons émettre l'hypothèse d'une régulation positive de la voie PI3K/AKT/mTOR par l'alcool. Cependant au regard de nos résultats, il semble que l'alcool impacte fortement des acteurs en amont de la voie PI3K/AKT/mTOR de manière totalement indépendante de la voie de l'hCG.

De fait, une autre voie impliquée dans l'angiogenèse est impactée par l'alcool *in vivo* : la voie impliquant les récepteurs VEGFR1 et R2. Le récepteur VEGFR2 est activé (entre autres) par CD44 (Tremmel et al. 2009) et ADAM10 (Welsh et al. 2010, Donners et al. 2010). La fixation de CD44 et VEGFR2 permet l'induction de l'activation de la voie de signalisation de PI3K/AKT/mTOR. Chacun des éléments de cette voie est activé en cascade et est nécessaire à son action pro-angiogénique.

L'effet de l'alcool sur cette voie a été étudié dans les modèles de villosités entières (protéomique/transcriptomique) et les cellules trophoblastiques en culture primaire (transcriptomique). L'alcool *in vivo* diminue significativement l'expression protéique de CD44 et transcriptionnelle de ADAM10 dans le modèle de villosité. L'alcool aurait donc par cette voie, un contrôle négatif sur la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR. De plus l'expression de PDK1, qui forme un dimère avec AKT pour l'activation de la voie mTOR, est diminuée par l'exposition à l'alcool *in vivo* sur le modèle de villosité entière.

En parallèle de la voie médiée par les récepteurs VEGF, une voie impliquant le récepteur RTK peut également médier positivement la voie PI3K/AKT/mTOR (Tremmel et al. 2009, Neben et al. 2019, Haddadi et al. 2018). Dans le cadre de notre étude, nous avons mis en évidence l'augmentation significative de l'expression transcriptionnelle d'IL6 sur un modèle de villosité entière exposée à l'alcool *in vivo*. Cette interleukine IL6 ne peut pas expliquer à elle seule les effets. Cependant, comme nous l'avons déjà décrit, l'expression de CD44 est diminuée par l'alcool *in vivo*. Le rapport de ces deux facteurs peut être intéressant à investiguer. En effet IL6 et CD44 peuvent activer ce récepteur qui a un rôle direct sur la phosphorylation de PIP2 en PIP3 induisant l'activation de la voie AKT. De plus CD44 intervient également dans l'activation de VEGFR2. L'équilibre de l'action de CD44 sur ces deux voies pourrait être modifié sous l'effet de l'alcool. Il serait donc intéressant de regarder directement l'effet de l'alcool sur le récepteur RTK.

PTEN est une phosphatase jouant un rôle clé dans la déphosphorylation de PIP3 en PIP2, ce qui lui confère un rôle de régulateur négatif de la voie de signalisation intracellulaire contrôlée par la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K), inhibant ainsi l'action de la voie PI3K/AKT/mTOR (Haddadi et al. 2018, Makker et al. 2012). L'expression transcriptionnelle de PTEN est diminuée dans le modèle de villosité entière exposée à l'alcool. De plus, l'expression protéique de PTEN est absente dans quatre des cinq villosités exposées à l'alcool *in vivo*. Il serait intéressant d'appréhender les mécanismes de

la dégradation de PTEN, notamment en lien avec l'ubiquitinylation. Lors de l'exposition à l'alcool *in vivo*, cette perte d'expression, et tout particulièrement dans le rôle de navette nucléo-cytoplasmique de PTEN dans la régulation des gènes pourrait engendrer ainsi une perte de contrôle de la régulation de l'angiogenèse, pouvant ainsi conduire à l'activation des voies cancérigènes comme cela est largement décrit.

Nous avons ainsi mis en évidence une forte altération de la voie PI3K/AKT dans le placenta dans un contexte d'une alcoolisation *in utero*. Cependant si l'on regarde l'analyse du protéome des villosités placentaires exposées à l'alcool *in vivo* par le logiciel Ingenuity, la voie PI3K/AKT n'est pas prédite comme étant significativement activée ou inhibée (z-score = -1.342) malgré une altération très fortement significative de son fonctionnement et de nombreux partenaires de cette voie (p-value= 7.41E-04). Du fait que cette voie soit particulièrement importante pour le fonctionnement placentaire, il semble évident qu'il existe des systèmes de compensation permettant de maintenir une homéostasie placentaire, afin de limiter les effets de l'alcool de manière globale et de mener à terme la grossesse.

Il est bien décrit que la voie PI3K/AKT est directement reliée à celle de mTOR. Nous avons aussi étudié plus spécifiquement cette voie dans le cadre d'une exposition à l'alcool au cours de la grossesse, en utilisant toujours le même modèle de villosité placentaire pour connaître l'impact de l'alcool *in vivo* sur le placenta (Analyse du protéome et des transcrits de gènes d'intérêt). L'alcool a entraîné la diminution significative de l'expression transcriptionnelle de TSC1, TSC2 et de RICTOR permettant de mettre en évidence une dérégulation de la voie mTOR. Alors que l'inhibition de TSC1/TSC2 pourrait provoquer une suractivation de la voie mTOR amenant ainsi les cellules vers une voie de prolifération cellulaire et une inflammation non contrôlée, l'expression de RICTOR est elle aussi diminuée, engendrant un rétrocontrôle et permettant de compenser la dérégulation de la voie PI3K/AKT en amont. Cette hypothèse de compensation est confirmée par l'analyse du protéome de villosités exposées à l'alcool *in vivo* mettant en évidence une forte altération de la voie mTOR (p-value= 6.23E-03) mais le logiciel Ingenuity ne prédit pas d'activation ou d'inhibition de la voie (z-score = 0.447).

Malgré un impact très fort de l'alcool sur l'angiogenèse placentaire, il semble qu'il existe un système de compensation permettant de maintenir un équilibre des différentes voies afin de conduire la grossesse jusqu'à terme. Cependant, une compensation des systèmes

n'exclut pas qu'une altération significative de l'alcool sur certains acteurs puisse jouer un rôle dans les mécanismes de toxicité placentaire de l'alcool et avoir un impact sur le développement fœtal.

C'est le cas de PTEN, ADAM10 et CD44, qui ont tous les trois leur expression (transcriptionnelle et protéique) diminuée par l'exposition à l'alcool *in vivo* dans un modèle de villosité placentaire.

De manière intéressante, dans la littérature il a déjà été décrit qu'une exposition *in vitro* à l'alcool [9g/L] diminuait l'expression transcriptionnelle de PTEN, dans un modèle de cellules de foie humain (Zhu et al. 2019). De plus, Endersby et Baker en 2008 ont démontré le rôle primordial de PTEN dans la régulation de l'angiogenèse cérébrale sur un modèle murin. De la même manière, Cui et al. en 2021, ont montré la fonction essentielle de l'axe PTEN/AKT au niveau de la barrière hémato-encéphalique, permettant la régulation de perméabilité et le passage de nombreuses molécules d'un côté à l'autre de cette barrière. Enfin des études ont démontré un lien entre la dérégulation de PTEN et les troubles autistiques (Li et Pozzo-Miller. 2019, Koboldt et al. 2021).

ADAM10 est une métalloprotéase particulièrement essentielle au développement du cerveau embryonnaire et fœtal et à son bon fonctionnement tout au long de la vie (Saftig et Lichtenthaler. 2015). Une étude de Appel et al. en 2021 a mis en évidence sur un modèle de souris mutée pour le gène (ne présentant pas l'expression d'ADAM10) le rôle primordial de cette métalloprotéase dans la neuroprotection. En effet, la perte de l'expression d'ADAM10 avait provoqué une dérégulation de différents neurorécepteurs (et en particulier GRIA1 et GRIN2B), ainsi qu'une augmentation des marqueurs de l'inflammation. Plusieurs études ont mis en évidence son rôle dans le développement de la crête neurale, de la corde spinale et de la mise en place du cortex (Tan et al. 2016, Yan et al. 2014, Jorissen et al. 2010). De plus ces auteurs ont pu établir qu'une inhibition d'ADAM10 en début de grossesse pouvait être létale pour l'embryon. Enfin une revue de Zheng et al. en 2021 a souligné le rôle potentiel de la dérégulation d'ADAM10 dans les troubles autistiques. A notre connaissance nous montrons pour la première fois l'impact de l'alcool sur cette protéine.

CD44 représente une famille de glycoprotéines transmembranaires impliquées dans les mécanismes d'angiogenèse et de prolifération cellulaire et devient un bon marqueur de

diagnostic pour certaines tumeurs. Une revue de Chen et al. en 2020 a mis en évidence son rôle dans les pathologies de l'angiogenèse. Notamment une surexpression de CD44 a été observée dans les phénomènes d'ischémie chez la souris ou encore dans les processus d'angiogenèse tumorale (Chen et al. 2020, Mesrati et al. 2021). Récemment son rôle a été décrit dans la formation initiale des réseaux neuronaux (Wilson et al. 2021). Les auteurs ont ainsi décrit la rétention d'acide hyaluronique par CD44 en supprimant la synaptogenèse excitatrice, permettant ainsi une régularisation du développement des circuit neuronaux.

En conclusion, l'alcool impacte fortement toute la voie de l'angiogenèse placentaire mais des mécanismes de compensation seraient mis en place. Des études histologiques précises sur placenta de femmes ayant consommé de l'alcool pourraient être menées afin d'identifier des défauts de l'angiogenèse. Cette étude permettrait d'identifier ces défauts en fonction du degré et de la temporalité d'exposition à l'alcool au cours de la grossesse. Malgré tout, PTEN, ADAM10 et CD44 semblent jouer un rôle particulièrement intéressant dans l'angiogenèse placentaire et cérébrale et pourraient être de bons biomarqueurs placentaires d'alcoolisation au cours de la grossesse.

Comme cela a été décrit précédemment, différentes molécules altérées par l'alcool *in vivo* sur nos différents modèles possèdent un rôle dans l'inflammation et les voies de la cancérogenèse. Dans la littérature, de nombreuses publications mettent en évidence le rôle de l'alcool dans ces processus cancérigènes. En étudiant le protéome des villosités placentaires exposées à l'alcool *in vivo* et le sécrétome des placentas « contrôles » perfusés deux heures à une dose de 2g/L d'éthanol, nous avons pu mettre en évidence l'impact de l'alcool dans le placenta sur différentes voies de cancérogenèse, notamment celles associées au cancer du sein. Le protéome nous a permis de mettre en évidence l'altération significative de 238 voies impliquant 252 protéines jouant un rôle dans le développement des cancers. De manière surprenante, des voies impliquées dans le développement de tumeur et de carcinomes était prédites comme étant significativement activée par l'exposition à l'alcool *in vivo* dans le modèle de villosité entière. Également, des protéines retrouvées dans le sécrétome sont impliquées dans les phénomènes d'angiogenèse et d'inflammation, et pourraient être le reflet d'un effet rapide de l'alcool au niveau de la vascularisation placentaire. La sécrétion de ces protéines est diminuée par le passage de l'alcool *in vitro* pendant 2h.

En conclusion générale de ce travail de doctorat, nous avons mis une évidence l'importance réelle d'étudier l'impact de l'alcool sur le placenta dans le cadre des troubles causés par l'alcoolisme fœtal. Nous avons caractérisé pour la première fois le Syndrome d'Alcoolisme Placentaire (SAP) par de nombreuses atteintes fonctionnelles mais également par une « mémoire » du placenta au passage de l'alcool. De la même manière nous avons permis l'ouverture d'un nouvel axe d'étude de la neuroplacentologie par la découverte de l'expression de 73 récepteurs aux neurotransmetteurs au niveau du placenta humain en apportant une cartographie placentaire basée sur les différents stades de développement placentaire. Enfin nous avons permis de mettre en évidence une dizaine de biomarqueurs placentaires potentiels d'alcoolisation *in utero*. Certains de ces biomarqueurs sont directement liés au développement cérébral et permettraient de renforcer les études de l'axe placenta-cerveau.

A partir de ce travail, de nombreuses perspectives sont envisageables. Il est nécessaire de poursuivre les recherches pour établir un lien entre altération neurologique, dysfonctionnement placentaire et compensation de l'unité fœto-placentaire pour le maintien de la grossesse.

Tout d'abord l'exploration de l'hCG comme biomarqueur de l'exposition à l'alcool *in vivo*. Notamment une étude sur une cohorte plus importante avec un dosage dans le sang de cordon et le sang maternel accompagné de l'analyse des sécrétions par les trophoblastes en culture devrait nous permettre d'éclaircir cette voie.

Par nos différentes analyses et *via* la diversité des échantillons placentaires des femmes ayant consommé de l'alcool au cours de leur grossesse, nous avons pu mettre en évidence une mémoire placentaire de l'exposition à l'alcool *in vivo*, et ce, peu importe la dose ou le temps d'exposition. Plusieurs axes majeurs peuvent être développés :

- Obtenir une cohorte prospective d'échantillons placentaires, de sang maternel et de sang de cordon afin de vérifier plusieurs hypothèses. Nos collaborations actuelles pourront se poursuivre en lien avec le réseau TSAF-R.
- Une analyse épigénétique, et en particulier les méthylations de l'ADN de villosités placentaires exposées à l'alcool *in vivo* en comparaison avec les villosités « contrôle » sera déterminant dans la compréhension des mécanismes de mémoire

placentaire. De plus l'analyse du méthylome de villosités placentaires issues d'IVG précoces (avec une attention particulière à ne récupérer que des prélèvements n'ayant pas été exposés à l'alcool *in vivo*, si possible avec une étude clinique et consentement précis) nous permettrait de comprendre l'impact de l'alcool sur les mécanismes de maturation placentaire. Une signature épigénétique du placenta et dans le sang de cordon pourrait être établie afin d'identifier des biomarqueurs précoces supplémentaires associés à l'exposition prénatale à l'alcool.

- Les voies de signalisation sont au centre des régulations. Ainsi une analyse de la phosphorylation des protéines *via* un phosphoprotéome et/ou de l'ubiquitinylation nous permettrait d'augmenter encore la compréhension des mécanismes, notamment au niveau de l'angiogenèse placentaire. En effet, l'étude de la phosphorylation des protéines dont l'expression est impactée par l'alcool *in vivo* nous permettrait d'affirmer ou d'infirmer les voies de signalisation proposées pour expliquer l'effet de l'alcool au niveau de la barrière placentaire. Le suivi de l'ubiquitinylation serait intéressant à étudier dans le contexte de la régulation par PTEN. De plus cette analyse nous permettrait de mettre en évidence des modifications post traductionnelle induite par l'exposition du placenta à l'alcool *in vivo*.
- Une analyse des voies de cancérogenèse au niveau placentaire afin de mettre en avant le rôle de l'alcool comme facteur de risque pour l'enfant de développer des maladies chroniques à terme, comme les cancers. Nous suspectons un lien entre exposition à l'alcool avec des marqueurs placentaires et la carcinogenèse. Ainsi, en s'appuyant sur des modèles animaux, nous pourrions générer un profil moléculaire détaillé de la programmation périnatale et placentaire par l'alcool.
- Une analyse complète (Western Blot et RTqPCR) de chacune des protéines pouvant être un biomarqueur potentiel d'alcoolisation au cours de la grossesse sera nécessaire afin d'affirmer l'intérêt réel de leur étude dans le cadre des TCAF.

- Enfin, des analyses grâce au modèle de perfusion nous permettrait d'étudier l'impact de transporteurs/récepteurs dérégulés en utilisant des substrats de ces protéines membranaires dans des conditions pathologiques (placentas alcool) ou des inhibiteurs spécifiques de transporteurs/récepteurs afin de mieux appréhender les échanges entre mère et fœtus.

Bibliographie

A

- Adibi, J.J., Xun, X., Zhao, Y., Yin, Q., LeWinn, K., Bush, N.R., Panigrahy, A., Peddada, S., Alfthan, H., Stenman, U.-H., Tylavsky, F., Koistinen, H., 2021. Second-Trimester Placental and Thyroid Hormones Are Associated With Cognitive Development From Ages 1 to 3 Years. *Journal of the Endocrine Society* 5, bvab027. <https://doi.org/10.1210/jendso/bvab027>
- Albrecht, E.D., Pepe, G.J., 1990. Placental Steroid Hormone Biosynthesis in Primate Pregnancy*. *Endocrine Reviews* 11, 124–150. <https://doi.org/10.1210/edrv-11-1-124>
- Androutsopoulos, G., Gkogkos, P., Decavalas, G., 2013. Mid-Trimester Maternal Serum hCG and Alpha Fetal Protein Levels: Clinical Significance and Prediction of Adverse Pregnancy Outcome. <https://doi.org/10.5812/ijem.5014>
- Angerville B., 2018, Evolution des troubles cognitifs au cours du sevrage dans l'alcoolodépendance : revue systématique de la littérature, Thèse de doctorat.
- Appel, D., Hummel, R., Weidemeier, M., Endres, K., Gölz, C., Schäfer, M.K.E., 2021. Pharmacologic Inhibition of ADAM10 Attenuates Brain Tissue Loss, Axonal Injury and Pro-inflammatory Gene Expression Following Traumatic Brain Injury in Mice. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 661462. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.661462>
- Attri, A., Sharma, P., 2021. Hyperemesis Gravidarum and Hyperthyroidism. *Int J Health Sci Res* 11, 75–78. <https://doi.org/10.52403/ijhsr.20210911>
- Aye, I.L.M.H., Aiken, C.E., Charnock-Jones, D.S., Smith, G.C.S., 2022. Placental energy metabolism in health and disease—significance of development and implications for preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 226, S928–S944. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2020.11.005>
- Azeez, J.M., Susmi, T.R., Remadevi, V., Ravindran, V., Sasikumar, A., 2021. New insights into the functions of progesterone receptor (PR) isoforms and progesterone signaling. PMC8640821

B

- Balbo, S., Hecht, S.S., 2014. Quantitation of Acetaldehyde-DNA Adducts: Biomarkers of Alcohol Consumption, in: Bode, A.M., Dong, Z. (Eds.), *Cancer Prevention, Methods in Pharmacology and Toxicology*. Springer New York, New York, NY, pp. 237–248. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9227-6_11
- Bear, M.F., Connors, B.W., Paradiso, M.A., 2016. *Neurosciences : A la découverte du cerveau*. John Libbey Eurotext . Edition Pradel. ISBN 978-2-36110-082-7

- Bearer, C.F., Jacobson, J.L., Jacobson, S.W., Barr, D., Croxford, J., Molteno, C.D., Viljoen, D.L., Marais, A.-S., Chiodo, L.M., Cwik, A.S., 2003. Validation of a new biomarker of fetal exposure to alcohol. *The Journal of Pediatrics* 143, 463–469. [https://doi.org/10.1067/S0022-3476\(03\)00442-6](https://doi.org/10.1067/S0022-3476(03)00442-6)
- Beck, F., 2016 Les produits psychoactifs et leurs consommateurs ; Quels usagers ? Quelles substances ? Les produits psychoactifs et leurs consommateurs. Actualité et dossier en santé publique (Haut conseil de la santé publique) n° 95. 12-19
- Bekdash, R.A., Harrison, N.L., 2015. Downregulation of *Gabra4* expression during alcohol withdrawal is mediated by specific micro RNA s in cultured mouse cortical neurons. *Brain Behav* 5. <https://doi.org/10.1002/brb3.355>
- Bellizzi, S., Mannava, P., Nagai, M., Sobel, H.L., 2020. Reasons for discontinuation of contraception among women with a current unintended pregnancy in 36 low and middle-income countries. *Contraception* 101, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.contraception.2019.09.006>
- Beloosesky, R., Gayle, D.A., Amidi, F., Ahanya, S.N., Desai, M., Ross, M.G., 2006. Ontogenic expression of putative feeding peptides in the rat fetal brain and placenta. *Nutritional Neuroscience* 9, 33–40. <https://doi.org/10.1080/10284150600630676>
- Bérard, V.L., 1995. Alcoolodépendance: métabolites toxiques de l'éthanol et neuromédiateurs. dumas-02095529. <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02095529>
- Berveiller P., 2014 Cancer du sein pendant la grossesse : Interactions des taxanes avec le trophoblaste humain par une approche ex vivo et in vitro. Thèse de doctorat
- Bookstein, F.L., Sampson, P.D., Streissguth, A.P., Connor, P.D., 2001. Geometric Morphometrics of Corpus Callosum and Subcortical Structures in the Fetal-Alcohol-Affected Brain. *Teratology* 64:4 –32. <https://doi.org/10.1002/tera.1044>
- Boulfoul, T., 2019. Alcool et grossesse. dumas-02458265 <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02458265>
- Brun, S., Leguy, M.C., Bruneel, A., Fournier, T., Anselem, O., Guibourdenche, J., 2014. hCG in screening for aneuploidy: A possible role for its glycoforms? *Placenta* 35, 425–427. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.03.011>
- Brunson, K.L., Avishai-Eliner, S., Hatalski, C.G., Baram, T.Z., 2001. Neurobiology of the stress response early in life: evolution of a concept and the role of corticotropin releasing hormone. *Mol Psychiatry* 6, 647–656. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4000942>

Burd, L., 2016. FASD and ADHD: Are they related and How? BMC Psychiatry 16, 325, s12888-016-1028-x. <https://doi.org/10.1186/s12888-016-1028-x>

C

Capobianco, E., Martínez, N., Fornes, D., Higa, R., Di Marco, I., Basualdo, M.N., Faingold, M.C., Jawerbaum, A., 2013. PPAR activation as a regulator of lipid metabolism, nitric oxide production and lipid peroxidation in the placenta from type 2 diabetic patients. Molecular and Cellular Endocrinology 377, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.06.027>

Caputo, C., Wood, E., Jabbour, L., 2016. Impact of fetal alcohol exposure on body systems: A systematic review: Impact of Fetal Alcohol Exposure on Body Systems. Birth Defect Res C 108, 174–180. <https://doi.org/10.1002/bdrc.21129>

Casarini, L., Santi, D., Brigante, G., Simoni, M., 2018. Two Hormones for One Receptor: Evolution, Biochemistry, Actions, and Pathophysiology of LH and hCG. Endocrine Reviews 39, 549–592. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00065>

CDC. 2002 Alcohol Consumption Among Women Who Are Pregnant or Who Might Become Pregnant. MMWR 53(50);1178-1181. <https://www-cdcgov.proxy.insermbiblio.inist.fr/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5350a4.htm>

Cervený, L., Ptáková, Z., Cecková, M., Karahoda, R., Karbanová, S., Jirásková, L., Greenwood, S.L., Glazier, J.D., Staud, F., 2018. Equilibrative Nucleoside Transporter 1 (ENT1, *SLC29A1*) Facilitates Transfer of the Antiretroviral Drug Abacavir across the Placenta. Drug Metab Dispos 46, 1817–1826. <https://doi.org/10.1124/dmd.118.083329>

Chabenne, A., Moon, C., Ojo, C., Khogali, A., Nepal, B., Sharma, S., 2014. Biomarkers in fetal alcohol syndrome. Biomarkers and Genomic Medicine 6, 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.bgm.2014.01.002>

Chabra, S., 2018. Small For Gestational Age and Low Birthweight: Distinct Entities. American Journal of Gastroenterology 113, 441–442. <https://doi.org/10.1038/ajg.2017.499>

Chan, S.Y., Hancox, L.A., Martín-Santos, A., Loubière, L.S., Walter, M.N.M., González, A.-M., Cox, P.M., Logan, A., McCabe, C.J., Franklyn, J.A., Kilby, M.D., 2014. MCT8 expression in human fetal cerebral cortex is reduced in severe intrauterine growth restriction. Journal of Endocrinology 220, 85–95. <https://doi.org/10.1530/JOE-13-0400>

Chandrasekar, R., 2013. Alcohol and NMDA receptor: current research and future direction. Front. Mol. Neurosci. 6. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2013.00014>

- Chen, J., Nam, H.W., Lee, M.R., Hinton, D.J., Choi, S., Kim, T., Kawamura, T., Janak, P.H., Choi, D.-S., 2010. Altered glutamatergic neurotransmission in the striatum regulates ethanol sensitivity and intake in mice lacking ENT1. *Behavioural Brain Research* 208, 636–642. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.01.011>
- Chen, L., Fu, C., Zhang, Q., He, C., Zhang, F., Wei, Q., 2020. The role of CD44 in pathological angiogenesis. *FASEB j.* 34, 13125–13139. <https://doi.org/10.1096/fj.202000380RR>
- Cheong, M.-L., Wang, L.-J., Chuang, P.-Y., Chang, C.-W., Lee, Y.-S., Lo, H.-F., Tsai, M.-S., Chen, H., 2016. A Positive Feedback Loop between Glial Cells Missing 1 and Human Chorionic Gonadotropin (hCG) Regulates Placental hCG β Expression and Cell Differentiation. *Mol Cell Biol* 36, 197–209. <https://doi.org/10.1128/MCB.00655-15>
- Choi, D.-S., Cascini, M.-G., Mailliard, W., Young, H., Paredes, P., McMahon, T., Diamond, I., Bonci, A., Messing, R.O., 2004. The type 1 equilibrative nucleoside transporter regulates ethanol intoxication and preference. *Nat Neurosci* 7, 855–861. <https://doi.org/10.1038/nn1288>
- Choi, J., Smitz, J., 2014. Luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin: Origins of difference. *Molecular and Cellular Endocrinology* 383, 203–213. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.12.009>
- Claesson-Welsh, L., 2010. ADAM-Mediated Shedding, A New Flavor in Angiogenesis Regulation. *ATVB* 30, 2087–2088. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.215285>
- Clarke, T.-K., Dempster, E., Docherty, S.J., Desrivieres, S., Lourdsamy, A., Wodarcz, N., Ridinger, M., Maier, W., Rietschel, M., Schumann, G., 2012. Multiple polymorphisms in genes of the adrenergic stress system confer vulnerability to alcohol abuse: Alcoholism genetics. *Addiction Biology* 17, 202–208. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2010.00263.x>
- Cohn, B.A., Cirillo, P.M., Terry, M.B., 2019. DDT and Breast Cancer: Prospective Study of Induction Time and Susceptibility Windows. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 111, 803–810. <https://doi.org/10.1093/jnci/djy198>
- Cole, L.A., 2012. hCG, the wonder of today's science. *Reprod Biol Endocrinol* 10, 24. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-24>
- Copp, A.J., Greene, N.D., 2010. Genetics and development of neural tube defects. *The Journal of Pathology* 220, 217–230. <https://doi.org/10.1002/path.2643>
- Cordier, A.-G., 2019. Impact de la drépanocytose sur les fonctions et le développement placentaires. Thèse de Doctorat.
- Costa, M.A., 2016. The endocrine function of human placenta: an overview. *Reproductive BioMedicine Online* 32, 14–43. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.10.005>

- Costa-Mattioli, M., Monteggia, L.M., 2013. mTOR complexes in neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci* 16, 1537–1543. <https://doi.org/10.1038/nn.3546>
- Crépin, G., Bréart, G., 2016. L'alcoolisation fœtale. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine* 200, 601–621. [https://doi.org/10.1016/S0001-4079\(19\)30736-8](https://doi.org/10.1016/S0001-4079(19)30736-8)
- Cyrus, K., Wang, Q., Sharawi, Z., Noguchi, G., Kaushal, M., Chang, T., Rydzewski, W., Yeguech, W., Gibrel, F., Psaltis, J.B., Haddad, B.R., Martin, M.B., 2021. Role of calcium in hormone-independent and -resistant breast cancer. *Int. J. Cancer* 149, 1817–1827. <https://doi.org/10.1002/ijc.33745>

D

- Davis-Anderson, K.L., Berger, S., Lunde-Young, E.R., Naik, V.D., Seo, H., Johnson, G.A., Steen, H., Ramadoss, J., 2017. Placental Proteomics Reveal Insights into Fetal Alcohol Spectrum Disorders. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 41, 1551–1558. <https://doi.org/10.1111/acer.13448>
- De la Monte, S.M., Kril, J.J., 2014. Human alcohol-related neuropathology. *Acta Neuropathol* 127, 71–90. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1233-3>
- Delbaere, J., Vancamp, P., Van Herck, S.L.J., Bourgeois, N.M.A., Green, M.J., Wingate, R.J.T., Darras, V.M., 2017. MCT8 deficiency in Purkinje cells disrupts embryonic chicken cerebellar development. *Journal of Endocrinology* 232, 259–272. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0323>
- Denis Cook, J., 2003. Biochemical markers of alcohol use in pregnant women. *Clinical Biochemistry* 36, 9–19. [https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(02\)00424-1](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(02)00424-1)
- Denny, L., Coles, S., Blitz, R., 2017. Fetal Alcohol Syndrome and Fetal Alcohol Spectrum Disorders. *Am Fam Physician*. 96(8):515-522A. PMID 29094891
- Dervaux, A., Laqueille, X., 2017. Le traitement par thiamine (vitamine B1) dans l'alcoolodépendance. *La Presse Médicale* 46, 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2016.07.025>
- Devall, A.J., Papadopoulou, A., Podesek, M., Haas, D.M., Price, M.J., Coomarasamy, A., Gallos, I.D., 2021. Progestogens for preventing miscarriage: a network meta-analysis. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2021. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD013792.pub2>

- Devis-Jauregui, L., Eritja, N., Davis, M.L., Matias-Guiu, X., Llobet-Navàs, D., 2021. Autophagy in the physiological endometrium and cancer. *Autophagy* 17, 1077–1095. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1752548>
- Dick, D.M., Edenberg, H.J., Xuei, X., Goate, A., Kuperman, S., Schuckit, M., Crowe, R., Smith, T.L., Porjesz, B., Begleiter, H., Foroud, T., 2004. Association of GABRG3 With Alcohol Dependence: Alcoholism: Clinical & Experimental Research 28, 4–9. <https://doi.org/10.1097/01.ALC.0000108645.54345.98>
- Donners, M.M.P.C., Wolfs, I.M.J., Olieslagers, S., Mohammadi-Motahhari, Z., Tchaikovski, V., Heeneman, S., van Buul, J.D., Caolo, V., Molin, D.G.M., Post, M.J., Waltenberger, J., 2010. A Disintegrin and Metalloprotease 10 Is a Novel Mediator of Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Endothelial Cell Function in Angiogenesis and Is Associated With Atherosclerosis. *ATVB* 30, 2188–2195. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.213124>
- Dunn, G.A., Nigg, J.T., Sullivan, E.L., 2019. Neuroinflammation as a risk factor for attention deficit hyperactivity disorder. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 182, 22–34. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2019.05.005>

E

- Edison, R.J., Berg, K., Remaley, A., Kelley, R., Rotimi, C., Stevenson, R.E., Muenke, M., 2007. Adverse Birth Outcome Among Mothers With Low Serum Cholesterol. *Pediatrics* 120, 723–733. <https://doi.org/10.1542/peds.2006-1939>
- Endersby, R., Baker, S.J., 2008. PTEN signaling in brain: neuropathology and tumorigenesis. *Oncogene* 27, 5416–5430. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.239>
- Errasti-Murugarren, E., Díaz, P., Godoy, V., Riquelme, G., Pastor-Anglada, M., 2011. Expression and Distribution of Nucleoside Transporter Proteins in the Human Syncytiotrophoblast. *Mol Pharmacol* 80, 809–817. <https://doi.org/10.1124/mol.111.071837>
- Espinet, C., Argilés, J.M., 1984. Ethanol and acetaldehyde concentrations in the rat foeto-maternal system after an acute ethanol administration given to the mother. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie* 92, 339–344. <https://doi.org/10.3109/13813458409080609>
- Eudy, J.D., Spiegelstein, O., Barber, R.C., Wlodarczyk, B.J., Talbot, J., Finnell, R.H., 2000. Identification and Characterization of the Human and Mouse SLC19A3 Gene: A Novel Member of the Reduced Folate Family of Micronutrient Transporter Genes. *Molecular Genetics and Metabolism* 71, 581–590. <https://doi.org/10.1006/mgme.2000.3112>

F

- Fang, J.-L., Vaca, C.E., 1995. Development of a ³²P-postlabelling method for the analysis of adducts arising through the reaction of acetaldehyde with 2'-deoxyguanosine-3'-monophosphate and DNA. *Carcinogenesis* 16, 2177–2185.
<https://doi.org/10.1093/carcin/16.9.2177>
- Faraone, S.V., Mick, E., 2010. Molecular Genetics of Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Psychiatric Clinics of North America* 33, 159–180.
<https://doi.org/10.1016/j.psc.2009.12.004>
- Figueras, F., Gratacos, E., 2017. An integrated approach to fetal growth restriction. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 38, 48–58.
<https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2016.10.006>
- Floyd, R.L., Sidhu, J.S., 2004. Monitoring prenatal alcohol exposure. *Am. J. Med. Genet.* 127C, 3–9. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.30010>
- Fournier, T., Guibourdenche, J., Evain-Brion, D., 2015. Review: hCGs: Different sources of production, different glycoforms and functions. *Placenta* 36, S60–S65.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.02.002>
- Francois, L.N., Gorkczyca, L., Du, J., Bircsak, K.M., Yen, E., Wen, X., Tu, M.-J., Yu, A.-M., Illsley, N.P., Zamudio, S., Aleksunes, L.M., 2017. Down-regulation of the placental BCRP/ABCG2 transporter in response to hypoxia signaling. *Placenta* 51, 57–63.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.01.125>
- Fredriksson, R., Nordström, K.J.V., Stephansson, O., Hägglund, M.G.A., Schiöth, H.B., 2008. The solute carrier (SLC) complement of the human genome: Phylogenetic classification reveals four major families. *FEBS Letters* 582, 3811–3816.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.10.016>
- Friesema, E.C.H., Ganguly, S., Abdalla, A., Fox, J.E.M., Halestrap, A.P., Visser, T.J., 2003. Identification of Monocarboxylate Transporter 8 as a Specific Thyroid Hormone Transporter. *Journal of Biological Chemistry* 278, 40128–40135.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M300909200>

G

- Gabriel R., Bonneau S., Raimond E., 2020. Modifications physiologiques de l'organisme maternel. EMC - Obstétrique/Gynécologie 43-1 [http://dx.doi.org/10.1016/S0246-0335\(19\)46120-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0246-0335(19)46120-6)
- Gemma, S., Vichi, S., Testai, E., 2007. Metabolic and genetic factors contributing to alcohol induced effects and fetal alcohol syndrome. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 31, 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2006.06.018>
- Girault, V., Gilard, V., Marguet, F., Lesueur, C., Hauchecorne, M., Ramdani, Y., Laquerrière, A., Marret, S., Jégou, S., Gonzalez, B.J., Brasse-Lagnel, C., Bekri, S., 2017. Prenatal alcohol exposure impairs autophagy in neonatal brain cortical microvessels. *Cell Death Dis* 8, e2610–e2610. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.29>
- Glass, L., Graham, D.M., Dewese, B.N., Jones, K.L., Riley, E.P., Mattson, S.N., 2014. Correspondence of parent report and laboratory measures of inattention and hyperactivity in children with heavy prenatal alcohol exposure. *Neurotoxicology and Teratology* 42, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2014.01.007>
- Goldman, S., 2007. Progesterone receptor profile in the decidua and fetal membrane. *Front Biosci* 12, 634. <https://doi.org/10.2741/2088>
- Govorko, D., Bekdash, R.A., Zhang, C., Sarkar, D.K., 2012. Male Germline Transmits Fetal Alcohol Adverse Effect on Hypothalamic Proopiomelanocortin Gene Across Generations. *Biological Psychiatry* 72, 378–388. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.04.006>
- Groth, G.G., Longo, L.M., Martin, J.L., 2017. Social media and college student risk behaviors: A mini-review. *Addictive Behaviors* 65, 87–91. <https://doi.org/10.1016/j.addbeh.2016.10.003>
- Grove, K.L., Smith, M.S., 2003. Ontogeny of the hypothalamic neuropeptide Y system. *Physiology & Behavior* 79, 47–63. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(03\)00104-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(03)00104-5)
- Guitart, X., Chern, Y., Ferré, S., 2017. Targeting the equilibrative nucleoside transporter ENT1 in Huntington disease. *Oncotarget* 8, 12550–12551. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15111>
- Guzmán, Y.F., Ramsey, K., Stolz, J.R., Craig, D.W., Huentelman, M.J., Narayanan, V., Swanson, G.T., 2017. A gain-of-function mutation in the *GRIK2* gene causes neurodevelopmental deficits. *Neurol Genet* 3, e129. <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000129>

Guzman-Gutierrez, E., Veas, C., Leiva, A., Escudero, C., Sobrevia, L., 2014. Is a low level of free thyroxine in the maternal circulation associated with altered endothelial function in gestational diabetes? *Front. Pharmacol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00136>

H

Haas, D.M., Hathaway, T.J., Ramsey, P.S., 2019. Progestogen for preventing miscarriage in women with recurrent miscarriage of unclear etiology. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003511.pub5>

Haddadi, N., Lin, Y., Travis, G., Simpson, A.M., Nassif, N.T., McGowan, E.M., 2018. PTEN/PTENP1: 'Regulating the regulator of RTK-dependent PI3K/Akt signalling', new targets for cancer therapy. *Mol Cancer* 17, 37. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0803-3>

Haila, S., Hästbacka, J., Böhling, T., Karjalainen-Lindsberg, M.-L., Kere, J., Saarialho-Kere, U., 2001. SLC26A2 (Diastrophic Dysplasia Sulfate Transporter) is Expressed in Developing and Mature Cartilage But Also in Other Tissues and Cell Types. *J Histochem Cytochem.* 49, 973–982. <https://doi.org/10.1177/002215540104900805>

Halder, D., Mandal, C., Lee, B., Lee, J., Choi, M., Chai, J., Lee, Y., Jung, K., Chai, Y., 2015. *PCDHB14* - and *GABRB1* -like nervous system developmental genes are altered during early neuronal differentiation of NCCIT cells treated with ethanol. *Hum Exp Toxicol* 34, 1017–1027. <https://doi.org/10.1177/0960327114566827>

Härkönen, H., Loid, P., Mäkitie, O., 2021. SLC26A2-Associated Diastrophic Dysplasia and rMED—Clinical Features in Affected Finnish Children and Review of the Literature. *Genes* 12, 714. <https://doi.org/10.3390/genes12050714>

Hassn Mesrati, M., Syafruddin, S.E., Mohtar, M.A., Syahir, A., 2021. CD44: A Multifunctional Mediator of Cancer Progression. *Biomolecules* 11, 1850. <https://doi.org/10.3390/biom11121850>

Herlenius, E., Lagercrantz, H., 2004. Development of neurotransmitter systems during critical periods. *Experimental Neurology* 190, 8–21. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.03.027>

Ho, A.M.-C., Geske, J.R., Bakalkin, G., Winham, S.J., Karpyak, V.M., 2019. Correlations between sex-related hormones, alcohol dependence and alcohol craving. *Drug and Alcohol Dependence* 197, 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2019.01.029>

- Hovdenak, N., Haram, K., 2012. Influence of mineral and vitamin supplements on pregnancy outcome. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 164, 127–132. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2012.06.020>
- Howland, M.A., Sandman, C.A., Glynn, L.M., Crippen, C., Davis, E.P., 2016. Fetal exposure to placental corticotropin-releasing hormone is associated with child self-reported internalizing symptoms. *Psychoneuroendocrinology* 67, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.01.023>
- Huang, W., Zhou, J., Zhang, G., Zhang, Y., Wang, H., 2019. Decreased H3K9 acetylation level of LXR α mediated dexamethasone-induced placental cholesterol transport dysfunction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1864, 158524. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.158524>
- Hui, K.K., Takashima, N., Watanabe, A., Chater, T.E., Matsukawa, H., Nekooki-Machida, Y., Nilsson, P., Endo, R., Goda, Y., Saido, T.C., Yoshikawa, T., Tanaka, M., 2019. GABARAPs dysfunction by autophagy deficiency in adolescent brain impairs GABA A receptor trafficking and social behavior. *Sci. Adv.* 5, eaau8237. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau8237>

I

- Idänpään-Heikkilä, J., Jouppila, P., Åkerblom, H.K., Isoaho, R., Kauppila, E., Koivisto, M., 1972. Elimination and metabolic effects of ethanol in mother, fetus, and newborn infant. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 112, 387–393. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(72\)90483-8](https://doi.org/10.1016/0002-9378(72)90483-8)
- Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Stefovská, V., Hörster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J.W., 2000. Ethanol-Induced Apoptotic Neurodegeneration and Fetal Alcohol Syndrome. *Science* 287, 1056–1060. <https://doi.org/10.1126/science.287.5455.1056>
- Illsley, N.P., Baumann, M.U., 2020. Human placental glucose transport in fetoplacental growth and metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1866, 165359. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.12.010>
- INSERM, 2001. *Alcool, effets sur la santé*. Rapport INSERM ISBN : 2-85598-797-0
- INSERM, 2021. *Réduction des dommages associés à la consommation d'alcool : Synthèse et recommandations, expertise collective*. Éditions EDP Sciences, 978-2-7598-2603-3 <http://ipubli-inserm.inist.fr/handle/10608/1>

J

- Jawerbaum, A., Capobianco, E., 2011. Review: Effects of PPAR activation in the placenta and the fetus: Implications in maternal diabetes. *Placenta* 32, S212–S217. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2010.12.002>
- Jing, G., Yao, J., Dang, Y., Liang, W., Xie, L., Chen, J., Li, Z., 2021. The role of β -HCG and VEGF-MEK/ERK signaling pathway in villi angiogenesis in patients with missed abortion. *Placenta* 103, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2020.10.005>
- Jones K.L., Smith D.W., 1973. Cognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. *The Lancet* 999-1001. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(73\)91092-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(73)91092-1)
- Judge, A., Dodd, M.S., 2020. Metabolism. *Essays in Biochemistry* 64, 607–647. <https://doi.org/10.1042/EBC20190041>
- Jung, H.J., Priefer, R., 2021. Tachykinin NK2 antagonist for treatments of various disease states. *Autonomic Neuroscience* 235, 102865. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2021.102865>

K

- Kaisari, P., Dourish, C.T., Higgs, S., 2017. Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) and disordered eating behaviour: A systematic review and a framework for future research. *Clinical Psychology Review* 53, 109–121. <https://doi.org/10.1016/j.cpr.2017.03.002>
- Kalisch-Smith, J.I., Outhwaite, J.E., Simmons, D.G., Pantaleon, M., Moritz, K.M., 2016. Alcohol exposure impairs trophoblast survival and alters subtype-specific gene expression in vitro. *Placenta* 46, 87–91. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2016.08.080>
- Kao, Y.-C., Ho, P.-C., Tu, Y.-K., Jou, I.-M., Tsai, K.-J., 2020. Lipids and Alzheimer's Disease. *IJMS* 21, 1505. <https://doi.org/10.3390/ijms21041505>
- Karl, P.I., Fisher, S.E., 1993. Ethanol Alters Hormone Production in Cultured Human Placental Trophoblasts. *Alcoholism Clin Exp Res* 17, 816–821. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1993.tb00847.x>
- Karzbrun, E., Khankhel, A.H., Megale, H.C., Glasauer, S.M.K., Wyle, Y., Britton, G., Warmflash, A., Kosik, K.S., Siggia, E.D., Shraiman, B.I., Streichan, S.J., 2021. Human neural tube morphogenesis in vitro by geometric constraints. *Nature* 599, 268–272. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04026-9>

- Kelly, S.J., Day, N., Streissguth, A.P., 2000. Effects of prenatal alcohol exposure on social behavior in humans and other species. *Neurotoxicology and Teratology* 22, 143–149. [https://doi.org/10.1016/S0892-0362\(99\)00073-2](https://doi.org/10.1016/S0892-0362(99)00073-2)
- King, B.R., Nicholson, R.C., Smith, R., 2001. Placental Corticotrophin-releasing Hormone, Local Effects and Fetomaternal Endocrinology. *Stress* 4, 219–233. <https://doi.org/10.3109/10253890109014747>
- Kleiber, M.L., Wright, E., Singh, S.M., 2011. Maternal voluntary drinking in C57BL/6J mice: Advancing a model for fetal alcohol spectrum disorders. *Behavioural Brain Research* 223, 376–387. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.05.005>
- Klinjampa, R., Sitticharoon, C., Souvannavong-Vilivong, X., Sripong, C., Keadkraichaiwat, I., Churintaraphan, M., Chatree, S., Lertbunnaphong, T., 2019. Placental *Neuropeptide Y* (*NPY*) and *NPY* receptors expressions and serum *NPY* levels in preeclampsia. *Exp Biol Med* (Maywood) 244, 380–388. <https://doi.org/10.1177/1535370219831437>
- Koboldt, D.C., Miller, K.E., Miller, A.R., Bush, J.M., McGrath, S., Leraas, K., Crist, E., Fair, S., Schwind, W., Wijeratne, S., Fitch, J., Leonard, J., Shaikhouni, A., Hester, M.E., Magrini, V., Ho, M.-L., Pierson, C.R., Wilson, R.K., Ostendorf, A.P., Mardis, E.R., Bedrosian, T.A., 2021. *PTEN* somatic mutations contribute to spectrum of cerebral overgrowth. *Brain* 144, 2971–2978. <https://doi.org/10.1093/brain/awab173>
- Koulentaki, M., Kouroumalis, E., 2018. *GABAA* receptor polymorphisms in alcohol use disorder in the GWAS era. *Psychopharmacology* 235, 1845–1865. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-4918-4>
- Koutmani, Y., Politis, P.K., Elkouris, M., Agrogiannis, G., Kemerli, M., Patsouris, E., Remboutsika, E., Karalis, K.P., 2013. Corticotropin-releasing hormone exerts direct effects on neuronal progenitor cells: implications for neuroprotection. *Mol Psychiatry* 18, 300–307. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.198>
- Krishnamoorthy, M., Gerwe, B.A., Scharer, C.D., Heimbürg-Molinaro, J., Gregory, F., Nash, Rachel J., Arumugham, J., Usta, S.N., Eilertson, C.D., Stice, S.L., Nash, Rodney J., 2011. *GABRB3* gene expression increases upon ethanol exposure in human embryonic stem cells. *Journal of Receptors and Signal Transduction* 31, 206–213. <https://doi.org/10.3109/10799893.2011.569723>

Kumar, P., Nagarajan, A., Uchil, P.D., 2018. Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. Cold Spring Harb Protoc., <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095497>

L

Ladrague, P. (Dr), 1901. Alcoolisme et enfants, source gallica.bnf.fr//Bibliothèque Nationale de France

Lalouette, J., 1980. La consommation de vin et d'alcool au cours du XIX e et au début du XX e siècle. *Ethnologie française*, nouvelle serie, T. 10 287–302.

Lecarpentier, Édouard., Vieillefosse, S., Haddad, B., Fournier, T., Leguy, M.-C., Guibourdenche, J., Tsatsaris, V., 2016. Placental growth factor (PLGF) and sFlt-1 during pregnancy: physiology, assay and interest in preeclampsia. *Annales de biologie clinique* 74, 259–267. <https://doi.org/10.1684/abc.2016.1158>

Lecuyer, M., Laquerrière, A., Bekri, S., Lesueur, C., Ramdani, Y., Jégou, S., Uguen, A., Marcorelles, P., Marret, S., Gonzalez, B.J., 2017. PLGF, a placental marker of fetal brain defects after in utero alcohol exposure. *acta neuropathol commun* 5, 44. <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0444-6>

Legault, L.M., Doiron, K., Breton-Larrivée, M., Langford-Avelar, A., Lemieux, A., Caron, M., Jerome-Majewska, L.A., Sinnett, D., McGraw, S., 2021. Pre-implantation alcohol exposure induces lasting sex-specific DNA methylation programming errors in the developing forebrain. *Clin Epigenet* 13, 164. <https://doi.org/10.1186/s13148-021-01151-0>

Lehikoinen, A., Voutilainen, R., Romppanen, J., Heinonen, S., 2020. The effect of maternal alcohol and drug abuse on first trimester screening analytes: a retrospective cohort study. *BMC Pregnancy Childbirth* 20, 562. <https://doi.org/10.1186/s12884-020-03171-9>

Lemoine, P., Harousseau, H., Borteyru, J.P., Menuet, J.C., 2003. Children of Alcoholic Parents— Observed Anomalies: Discussion of 127 Cases: *Therapeutic Drug Monitoring* 25, 132–136. <https://doi.org/10.1097/00007691-200304000-00002>

Leno, D.W.A., Camara, M.K., Kouyate, S., Diallo, F.D., Tolno, J., Hijazy, Y., Keita, N., 2017. Les déterminants maternels associés au petit poids pour l'âge gestationnel à la maternité de l'hôpital Donka de Conakry. *Revue de Medecine Perinatale* 9, 178–183.

Leyrer-Jackson, J.M., Hood, L.E., Olive, M.F., 2021. Alcohol consumption preferentially activates a subset of pro-opiomelanocortin (POMC) producing neurons targeting the amygdala. *Neuropharmacology* 195, 108674. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108674>

- Li, W., Pozzo-Miller, L., 2020. Dysfunction of the corticostriatal pathway in autism spectrum disorders. *J Neurosci Res* 98, 2130–2147. <https://doi.org/10.1002/jnr.24560>
- Li, X., Zou, H., Brown, W.T., 2012. Genes associated with autism spectrum disorder. *Brain Research Bulletin* 88, 543–552. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2012.05.017>
- Liang, C.-Y., Wang, L.-J., Chen, C.-P., Chen, L.-F., Chen, Y.-H., Chen, H., 2010. GCM1 Regulation of the Expression of Syncytin 2 and Its Cognate Receptor MFSD2A in Human Placenta. *Biology of Reproduction* 83, 387–395. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.083915>
- Lieber, C.S., 2005. Metabolism of Alcohol. *Clinics in Liver Disease* 9, 1–35. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2004.10.005>
- Liu, H., Ma, Y., He, H.-W., Wang, J.-P., Jiang, J.-D., Shao, R.-G., 2015. SLC9A3R1 stimulates autophagy via BECN1 stabilization in breast cancer cells. *Autophagy* 11, 2323–2334. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1074372>
- Lo, C.-L., Lossie, A.C., Liang, T., Liu, Y., Xuei, X., Lumeng, L., Zhou, F.C., Muir, W.M., 2016. High Resolution Genomic Scans Reveal Genetic Architecture Controlling Alcohol Preference in Bidirectionally Selected Rat Model. *PLoS Genet* 12, e1006178. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006178>
- Lowry, P., 2018. Morning sickness is just the side effect of a new tachykinin that the placenta secretes to improve local blood flow. *Journal of Molecular Endocrinology* 60, C1–C2. <https://doi.org/10.1530/JME-17-0274>
- Lussier, A.A., Morin, A.M., MacIsaac, J.L., Salmon, J., Weinberg, J., Reynolds, J.N., Pavlidis, P., Chudley, A.E., Kobor, M.S., 2018. DNA methylation as a predictor of fetal alcohol spectrum disorder. *Clin Epigenet* 10, 5. <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0439-6>
- Ludwig, M., Stern J. 2015. Multiple signalling modalities mediated by dendritic exocytosis of oxytocin and vasopressin. *Phil. Trans. R. Soc.* B370:20140182. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2014.0182>

M

- Mackus, M., van de Loo, A.J., Garssen, J., Kraneveld, A.D., Scholey, A., Verster, J.C., 2020. The Association between Ethanol Elimination Rate and Hangover Severity. *IJERPH* 17, 4324. <https://doi.org/10.3390/ijerph17124324>
- Makker, A., Goel, M.M., Das, V., Agarwal, A., 2012. PI3K-Akt-mTOR and MAPK signaling pathways in polycystic ovarian syndrome, uterine leiomyomas and endometriosis: an

update. Gynecological Endocrinology 28, 175–181.
<https://doi.org/10.3109/09513590.2011.583955>

Manta-Vogli, P.D., Schulpis, K.H., Dotsikas, Y., Loukas, Y.L., 2020. The significant role of amino acids during pregnancy: nutritional support. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 33, 334–340. <https://doi.org/10.1080/14767058.2018.1489795>

Marcé-Grau, A., Elorza-Vidal, X., Pérez-Rius, C., Ruiz-Nel-lo, A., Sala-Coromina, J., Gabau, E., Estévez, R., Macaya, A., 2021. Muscarinic acetylcholine receptor M1 mutations causing neurodevelopmental disorder and epilepsy. *Human Mutation* 42, 1215–1220. <https://doi.org/10.1002/humu.24252>

Marcé-Grau, A., Martí-Sánchez, L., Baide-Mairena, H., Ortigoza-Escobar, J.D., Pérez-Dueñas, B., 2019. Genetic defects of thiamine transport and metabolism: A review of clinical phenotypes, genetics, and functional studies. *Jrnl of Inher Metab Disea* 42, 581–597. <https://doi.org/10.1002/jimd.12125>

Mattson, S.N., Crocker, N., Nguyen, T.T., 2011. Fetal Alcohol Spectrum Disorders: Neuropsychological and Behavioral Features. *Neuropsychol Rev* 21, 81–101. <https://doi.org/10.1007/s11065-011-9167-9>

Maumus, S., Marie, B., Vincent-Viry, M., Siest, G., Visvikis-Siest, S., 2007. Analysis of the effect of multiple genetic variants of cardiovascular disease risk on insulin concentration variability in healthy adults of the STANISLAS cohort. *Atherosclerosis* 191, 369–376. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2006.04.003>

Mauvais-Jarvis, F., Lange, C.A., Levin, E.R., 2021. Membrane-Initiated Estrogen, Androgen, and Progesterone Receptor Signaling in Health and Disease. *Endocrine Reviews* bnab041. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnab041>

McIntyre, K.R., Vincent, K.M.M., Hayward, C.E., Li, X., Sibley, C.P., Desforges, M., Greenwood, S.L., Dilworth, M.R., 2020. Human placental uptake of glutamine and glutamate is reduced in fetal growth restriction. *Sci Rep* 10, 16197. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72930-7>

Menold, M.M., Shao, Y., Wolpert, C.M., Donnelly, S.L., Raiford, K.L., Martin, E.R., Ravan, S.A., Abramson, R.K., Wright, H.H., DeLong, G.R., Cuccaro, M.L., Pericak-Vance, M.A., Gilbert, J.R., 2001. Association Analysis of Chromosome 15 GABA_A Receptor Subunit Genes in Autistic Disorder. *Journal of Neurogenetics* 15, 245–259. <https://doi.org/10.3109/01677060109167380>

- Molina, J.R., Agarwal, N.K., Morales, F.C., Hayashi, Y., Aldape, K.D., Cote, G., Georgescu, M.-M., 2012. PTEN, NHERF1 and PHLPP form a tumor suppressor network that is disabled in glioblastoma. *Oncogene* 31, 1264–1274. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.324>
- Monti, L., Paganini, C., Lecci, S., De Leonardis, F., Hay, E., Cohen-Solal, M., Villani, S., Superti-Furga, A., Tenni, R., Forlino, A., Rossi, A., 2015. *N*-acetylcysteine treatment ameliorates the skeletal phenotype of a mouse model of diastrophic dysplasia. *Hum. Mol. Genet.* 24, 5570–5580. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv289>
- Moore K. L., Persaud T.V.N., Torchia M. G., 2016. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*, ISBN 978-0-323-31347-6
- More, V.R., Campos, C.R., Evans, R.A., Oliver, K.D., Chan, G.N., Miller, D.S., Cannon, R.E., 2017. PPAR- α , a lipid-sensing transcription factor, regulates blood–brain barrier efflux transporter expression. *J Cereb Blood Flow Metab* 37, 1199–1212. <https://doi.org/10.1177/0271678X16650216>
- Mouzat, K., n.d. Etude du rôle des récepteurs nucléaires des oxystérols LXR alpha et LXR bêta dans la physiologie de la reproduction chez la souris femelle 443.
- Muthig, V., Gilsbach, R., Haubold, M., Philipp, M., Ivacevic, T., Gessler, M., Hein, L., 2007. Upregulation of Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 Contributes to Angiogenesis Defects in the Placenta of α_{2B} -Adrenoceptor-Deficient Mice. *Circulation Research* 101, 682–691. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.151563>

N

- Naassila, M., Daoust, M., 2002. Effect of prenatal and postnatal ethanol exposure on the developmental profile of mRNAs encoding NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *Journal of Neurochemistry* 80, 850–860. <https://doi.org/10.1046/j.0022-3042.2002.00755.x>
- Nagy, L.E., Diamond, I., Casso, D.J., Franklin, C., Gordon, A.S., 1990. Ethanol increases extracellular adenosine by inhibiting adenosine uptake via the nucleoside transporter. *Journal of Biological Chemistry* 265, 1946–1951. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)39923-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)39923-5)
- Neben, C.L., Lo, M., Jura, N., Klein, O.D., 2019. Feedback regulation of RTK signaling in development. *Developmental Biology* 447, 71–89. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.10.017>

- Nelson, B.S., Sequeira, M.K., Schank, J.R., 2018. Bidirectional relationship between alcohol intake and sensitivity to social defeat: association with *Tacr1* and *Avp* expression: Alcohol and social defeat. *Addiction Biology* 23, 142–153. <https://doi.org/10.1111/adb.12494>
- Newville, J., Howard, T.A., Chavez, G.J., Valenzuela, C.F., Cunningham, L.A., 2022. Persistent myelin abnormalities in a third trimester-equivalent mouse model of fetal alcohol spectrum disorder. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 46, 77–86. <https://doi.org/10.1111/acer.14752>
- Nikolopoulou, E., Galea, G.L., Rolo, A., Greene, N.D.E., Copp, A.J., 2017. Neural tube closure: cellular, molecular and biomechanical mechanisms. *Development* 144, 552–566. <https://doi.org/10.1242/dev.145904>
- Nordmann R., 2004. Consommation d'alcool, de tabac ou de cannabis au cours de la grossesse *Bull. Acad. Natle Méd.*, 188, no 3, 383-399
- Nuñez, S.C., Sowell, E.R., 2011. Focus on: Structural and Functional Brain Abnormalities in Fetal Alcohol Spectrum Disorders. *Alcohol Research & Health* V34-1 121-132 PMC3860550
- Nwabuobi, C., Arlier, S., Schatz, F., Guzeloglu-Kayisli, O., Lockwood, C., Kayisli, U., 2017. hCG: Biological Functions and Clinical Applications. *IJMS* 18, 2037. <https://doi.org/10.3390/ijms18102037>

O

- OCDE, 2021 Effets du COVID-19 sur la consommation d'alcool et mesures prises pour prévenir la consommation nocive d'alcool (Les réponses de l'OCDE face au coronavirus (COVID-19)). <https://doi.org/10.1787/600e9145-fr>

P

- Page, N.M., 2010. Neurokinin B and pre-eclampsia: a decade of discovery. *Reprod Biol Endocrinol* 8, 4. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-4>
- Page, N.M., Woods, R.J., Lowry, P.J., 2001. A regulatory role for neurokinin B in placental physiology and pre-eclampsia. *Regulatory Peptides* 98, 97–104. [https://doi.org/10.1016/S0167-0115\(00\)00239-1](https://doi.org/10.1016/S0167-0115(00)00239-1)
- Palaniappan, M., Menon, K.M.J., 2010. Human Chorionic Gonadotropin Stimulates Theca-Interstitial Cell Proliferation and Cell Cycle Regulatory Proteins by a cAMP-Dependent

- Activation of AKT/mTORC1 Signaling Pathway. *Molecular Endocrinology* 24, 1782–1793.
<https://doi.org/10.1210/me.2010-0044>
- Palomaki, G.E., Lambert-Messerlian, G.M., Canick, J.A., 2007. A Summary Analysis of Down Syndrome Markers in the Late First Trimester, in: *Advances in Clinical Chemistry*. Elsevier, pp. 177–210. [https://doi.org/10.1016/S0065-2423\(06\)43006-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2423(06)43006-7)
- Paquot N., 2019. Le métabolisme de l'alcool. *Rev Med Liege* 74(5-6):265-267
- Parchim, N.F., Wang, W., Iriyama, T., Ashimi, O.A., Siddiqui, A.H., Blackwell, S., Sibai, B., Kellems, R.E., Xia, Y., 2015. Neurokinin 3 Receptor and Phosphocholine Transferase: Missing Factors for Pathogenesis of C-Reactive Protein in Preeclampsia. *Hypertension* 65, 430–439. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04439>
- Paulesu, L., Rao, Ch.V., Ietta, F., Pietropolli, A., Ticconi, C., 2018. hCG and Its Disruption by Environmental Contaminants during Human Pregnancy. *IJMS* 19, 914. <https://doi.org/10.3390/ijms19030914>
- Pedrazzini, T., Pralong, F., Grouzmann, E., 2003. Neuropeptide Y: the universal soldier. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 60, 350–377. <https://doi.org/10.1007/s000180300029>
- Peng, L., Yang, H., Ye, Y., Ma, Z., Kuhn, C., Rahmeh, M., Mahner, S., Makrigiannakis, A., Jeschke, U., von Schönfeldt, V., 2021. Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) in Trophoblast Functions. *IJMS* 22, 433. <https://doi.org/10.3390/ijms22010433>
- Petraglia, F., Coukos, G., Battaglia, C., Bartolotti, A., Volpe, A., Nappi, C., Segre, A., Genazzani, A.R., 1989. Plasma and Amniotic Fluid Immunoreactive Neuropeptide-Y Level Changes during Pregnancy, Labor, and at Parturition. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 69, 324–328. <https://doi.org/10.1210/jcem-69-2-324>
- Petraglia, F., Coukos, G., Volpe, A., Genazzani, A.R., Vale, W., 1991. Involvement of Placental Neurohormones in Human Parturition. *Ann NY Acad Sci* 622, 331–340. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1991.tb37878.x>
- Petraglia, F., Florio, P., Nappi, C., Genazzani, A.R., 1996. Peptide Signaling in Human Placenta and Membranes: Autocrine, Paracrine, and Endocrine Mechanisms 17, 31.
- Petraglia, F., Florio, P., Vale, W.W., 2005. Placental expression of neurohormones and other neuroactive molecules in human pregnancy, in: Power, M.L., Schulkin, J. (Eds.), *Birth*,

Distress and Disease. Cambridge University Press, pp. 16–73.
<https://doi.org/10.1017/CBO9780511545658.003>

Petrelli, B., Weinberg, J., Hicks, G.G., 2018. Effects of prenatal alcohol exposure (PAE): insights into FASD using mouse models of PAE. *Biochem. Cell Biol.* 96, 131–147.
<https://doi.org/10.1139/bcb-2017-0280>

Pikkarainea, P.H., 1971. Metabolism of ethanol and acetaldehyde in perfused human fetal liver, *Life Sciences* Vol. 10, Part II, pp. 1359-1384 [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(71\)90187-1](https://doi.org/10.1016/0024-3205(71)90187-1)

Pikkarainen, P.H., Rähkä, N.C.R., 1967. Development of Alcohol Dehydrogenase Activity in the Human Liver. *Pediatr Res* 1, 165–168. <https://doi.org/10.1203/00006450-196705000-00001>

Poluch, S., König, N., 2002. AMPA receptor activation induces GABA release from neurons migrating tangentially in the intermediate zone of embryonic rat neocortex: GABA release by tangentially migrating neurons. *European Journal of Neuroscience* 16, 350–354.
<https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02068.x>

Poon, L.C., Shennan, A., Hyett, J.A., Kapur, A., Hadar, E., Divakar, H., McAuliffe, F., Silva Costa, F., Dadelszen, P., McIntyre, H.D., Kihara, A.B., Di Renzo, G.C., Romero, R., D'Alton, M., Berghella, V., Nicolaides, K.H., Hod, M., Hanson, M., Ma, R., Purandare, C., Fuchtnner, C., Visser, G., Morris, J., Gooden, R., 2019. The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) initiative on pre-eclampsia: A pragmatic guide for first-trimester screening and prevention. *Int J Gynecol Obstet* 145, 1–33.
<https://doi.org/10.1002/ijgo.12802>

Popova, S., World Health Organization, Centre for Addiction and Mental Health, 2018. World Health Organization international study on the prevalence of fetal alcohol spectrum disorder (FASD): Canadian component ISBN: 978-1-77114-410-0

Pruett, D., Waterman, E.H., Caughey, A.B., 2013. Fetal Alcohol Exposure: Consequences, Diagnosis, and Treatment. *Obstetrical & Gynecological Survey* 68, 62–69.
<https://doi.org/10.1097/OGX.0b013e31827f238f>

R

Refetoff, S., Pappa, T., Williams, M.K., Matheus, M.G., Liao, X.-H., Hansen, K., Nicol, L., Pierce, M., Blasco, P.A., Wiebers Jensen, M., Bernal, J., Weiss, R.E., Dumitrescu, A.M., LaFranchi, S.,

2021. Prenatal Treatment of Thyroid Hormone Cell Membrane Transport Defect Caused by *MCT8* Gene Mutation. *Thyroid* 31, 713–720. <https://doi.org/10.1089/thy.2020.0306>
- Rehm, J., Mathers, C., Popova, S., Thavorncharoensap, M., Teerawattananon, Y., Patra, J., 2009. Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders. *The Lancet* 373, 2223–2233. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60746-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60746-7)
- Rehm, J., Shield, K.D., 2019. Global Burden of Disease and the Impact of Mental and Addictive Disorders. *Curr Psychiatry Rep* 21, 10. <https://doi.org/10.1007/s11920-019-0997-0>
- Regoli, D., Rhaleb, N.-E., Dion, S., Tousignant, C., Rouissi, N., Jukic, D., Drapeau, G., 1990. Neurokinin A. A pharmacological study. *Pharmacological Research* 22, 1–14. [https://doi.org/10.1016/1043-6618\(90\)90738-Y](https://doi.org/10.1016/1043-6618(90)90738-Y)
- Riccio, O., Hurni, N., Murthy, S., Vutskits, L., Hein, L., Dayer, A., 2012. Alpha2-adrenergic receptor activation regulates cortical interneuron migration. *European Journal of Neuroscience* 36, 2879–2887. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08231.x>
- Richard, J.-B., Cogordan, C., Palle, C., Obradovic, I., 2015 Comportements de consommation et leur répartition : produits consommés et évolution. *Adsp* n°90
- Richard, J.-B., Palle, C., Guignard, R., Nguyen, V., Beck, F., Arwidson, P., 2015. La consommation d'alcool en France en 2014, *Book Evolution* n°32
- Richardson, D.P., Byrnes, M.L., Brien, J.F., Reynolds, J.N., Dringenberg, H.C., 2002. Impaired acquisition in the water maze and hippocampal long-term potentiation after chronic prenatal ethanol exposure in the guinea-pig. *European Journal of Neuroscience* 16, 1593–1598. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02214.x>
- Riley, E.P., Infante, M.A., Warren, K.R., 2011. Fetal Alcohol Spectrum Disorders: An Overview. *Neuropsychol Rev* 21, 73–80. <https://doi.org/10.1007/s11065-011-9166-x>
- Riley, E.P., McGee, C.L., 2005. Fetal Alcohol Spectrum Disorders: An Overview with Emphasis on Changes in Brain and Behavior. *Exp Biol Med (Maywood)* 230, 357–365. <https://doi.org/10.1177/15353702-0323006-03>
- Riley, J.D., Delahunty, C., Alsadah, A., Mazzola, S., Astbury, C., 2020. Further evidence of GABRA4 and TOP3B as autism susceptibility genes. *European Journal of Medical Genetics* 63, 103876. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2020.103876>
- Roberts, L.M., Woodford, K., Zhou, M., Black, D.S., Haggerty, J.E., Tate, E.H., Grindstaff, K.K., Mengesha, W., Raman, C., Zerangue, N., 2008. Expression of the Thyroid Hormone Transporters Monocarboxylate Transporter-8 (SLC16A2) and Organic Ion Transporter-

- 14 (SLC01C1) at the Blood-Brain Barrier. *Endocrinology* 149, 6251–6261. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0378>
- Rosenberg, M.J., Wolff, C.R., El-Emawy, A., Staples, M.C., Perrone-Bizzozero, N.I., Savage, D.D., 2010. Effects of moderate drinking during pregnancy on placental gene expression. *Alcohol* 44, 673–690. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2009.10.002>
- Rosenfeld, C.S., 2021. The placenta-brain-axis. *Journal of Neuroscience Research* 99, 271–283. <https://doi.org/10.1002/jnr.24603>
- Rosina, E., Battan, B., Siracusano, M., Di Criscio, L., Hollis, F., Pacini, L., Curatolo, P., Bagni, C., 2019. Disruption of mTOR and MAPK pathways correlates with severity in idiopathic autism. *Transl Psychiatry* 9, 50. <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0335-z>
- Ross, S.E., Greenberg, M.E., Stiles, C.D., 2003. Basic Helix-Loop-Helix Factors in Cortical Development. *Neuron* 39, 13–25. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00365-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00365-9)
- Rousseaux, S., Seyve, E., Chuffart, F., Bourova-Flin, E., Benmerad, M., Charles, Marie-Aline, Forhan, Anne, Heude, Barbara, Siroux, V., Slama, Remy, Tost, J., Vaiman, D., Khochbin, S., Lepeule, Johanna, the EDEN Mother-Child Cohort Study Group, Annesi-Maesano, I., Bernard, J.Y., Botton, J., Charles, M-A, Dargent-Molina, P., de Lauzon-Guillain, B., Ducimetière, P., de Agostini, M., Foliguet, B., Forhan, A., Fritel, X., Germa, A., Goua, V., Hankard, R., Heude, B., Kaminski, M., Larroque, B., Lelong, N., Lepeule, J., Magnin, G., Marchand, L., Nabet, C., Pierre, F., Slama, R., Saurel-Cubizolles, M.J., Schweitzer, M., Thiebaugeorges, O., 2020. Immediate and durable effects of maternal tobacco consumption alter placental DNA methylation in enhancer and imprinted gene-containing regions. *BMC Med* 18, 306. <https://doi.org/10.1186/s12916-020-01736-1>
- Rumgay, H., Murphy, N., Ferrari, P., Soerjomataram, I., 2021. Alcohol and Cancer: Epidemiology and Biological Mechanisms. *Nutrients* 13, 3173. <https://doi.org/10.3390/nu13093173>
- Ruys, C.A., Hollanders, J.J., Bröring, T., van Schie, P.E.M., van der Pal, S.M., van de Lagemaat, M., Lafeber, H.N., Rotteveel, J., Finken, M.J.J., 2019. Early-life growth of preterm infants and its impact on neurodevelopment. *Pediatr Res* 85, 283–292. <https://doi.org/10.1038/s41390-018-0139-0>

S

- Saftig, P., Lichtenthaler, S.F., 2015. The alpha secretase ADAM10: A metalloprotease with multiple functions in the brain. *Progress in Neurobiology* 135, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.10.003>

- Salazar, M., Lerma-Ortiz, A., Hooks, G.M., Ashley, A.K., Ashley, R.L., 2016. Progesterin-mediated activation of MAPK and AKT in nuclear progesterone receptor negative breast epithelial cells: The role of membrane progesterone receptors. *Gene* 591, 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.06.044>
- Sanchis, R., Guerri, C., 1986. Alcohol-Metabolizing Enzymes in Placenta and Fetal Liver: Effect of Chronic Ethanol Intake. *Alcoholism Clin Exp Res* 10, 39–44. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1986.tb05611.x>
- Saucisse, N., 2016. Dissection du rôle de la voie intracellulaire de mTORC1 dans les circuits hypothalamiques à la mélanocortine régulant la prise alimentaire. *Neurosciences [q-bio.NC]*. Université de Bordeaux. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01498462>
- Sautreuil C., 2019. Etude du CD146 placentaire comme biomarqueur de troubles de l'angiogenèse cérébrale suite à une alcoolisation in utero. Thèse de Doctorat
- Sawicki, G., Dakour, J., Morrish, D.W., 2003. Functional proteomics of neurokinin B in the placenta indicates a novel role in regulating cytotrophoblast antioxidant defences. *Proteomics* 3, 2044–2051. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300537>
- Schneider, H., Panigel, M., Dancis, J., 1972. Transfer across the perfused human placenta of antipyrine, sodium, and leucine. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 114, 822–828. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(72\)90909-X](https://doi.org/10.1016/0002-9378(72)90909-X)
- Sergent, O., Griffon, B., Cillard, P., Cillard, J., 2001. Alcool et stress oxydatif. *Pathologie Biologie* 49, 689–695. [https://doi.org/10.1016/S0369-8114\(01\)00244-9](https://doi.org/10.1016/S0369-8114(01)00244-9)
- Servent, D., Malgorn, C., Bernes, M., Gil, S., Simasotchi, C., Hérard, A.-S., Delzescaux, T., Thai, R., Barbe, P., Keck, M., Beau, F., Zakarian, A., Dive, V., Molgó, J., 2021. First evidence that emerging pinnatoxin-G, a contaminant of shellfish, reaches the brain and crosses the placental barrier. *Science of The Total Environment* 790, 148125. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148125>
- Sharkey, K.A., Wiley, J.W., 2016. The Role of the Endocannabinoid System in the Brain–Gut Axis. *Gastroenterology* 151, 252–266. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.04.015>
- Simmons, D.G., Rakoczy, J., Jefferis, J., Lourie, R., McIntyre, H.D., Dawson, P.A., 2013. Human placental sulfate transporter mRNA profiling from term pregnancies identifies abundant SLC13A4 in syncytiotrophoblasts and SLC26A2 in cytotrophoblasts. *Placenta* 34, 381–384. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2013.01.017>
- Sirikunalai, P., Wanapirak, C., Sirichotiyakul, S., Tongprasert, F., Srisupundit, K., Luewan, S., Traisrisilp, K., Tongsong, T., 2016. Associations between maternal serum free beta human

chorionic gonadotropin (β -hCG) levels and adverse pregnancy outcomes. *Journal of Obstetrics and Gynaecology* 36, 178–182.
<https://doi.org/10.3109/01443615.2015.1036400>

Smith, S.M., Garic, A., Flentke, G.R., Berres, M.E., 2014. Neural crest development in fetal alcohol syndrome: Neural Crest Development in Fas. *Birth Defect Res C* 102, 210–220.
<https://doi.org/10.1002/bdrc.21078>

Smith, R., Smith, J.I., Shen, X., Engel, P.J., Bowman, M.E., McGrath, S.A., Bisits, A.M., McElduff, P., Giles, W.B., Smith, D.W., 2009. Patterns of Plasma Corticotropin-Releasing Hormone, Progesterone, Estradiol, and Estriol Change and the Onset of Human Labor. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 94, 2066–2074.
<https://doi.org/10.1210/jc.2008-2257>

Solano, M.E., Arck, P.C., 2020. Steroids, Pregnancy and Fetal Development. *Front. Immunol.* 10, 3017. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03017>

Stevens, F., Katzorke, N., Tempfer, C., Kreimer, U., Bizjak, G., Fleisch, M., Fehm, T., 2015. Gestational Trophoblastic Disorders: An Update in 2015. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 75, 1043–1050. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1558054>

Sundermann, A.C., Zhao, S., Young, C.L., Lam, L., Jones, S.H., Velez Edwards, D.R., Hartmann, K.E., 2019. Alcohol Use in Pregnancy and Miscarriage: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Alcohol Clin Exp Res* 43, 1606–1616. <https://doi.org/10.1111/acer.14124>

T

Tan, Y., Fu, R., Liu, J., Wu, Y., Wang, B., Jiang, N., Nie, P., Cao, H., Yang, Z., Fang, B., 2016. ADAM10 is essential for cranial neural crest-derived maxillofacial bone development. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 475, 308–314.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.05.101>

Tanaka, T., Masubuchi, Y., Okada, R., Nakajima, K., Nakamura, K., Masuda, S., Nakahara, J., Maronpot, R.R., Yoshida, T., Koyanagi, M., Hayashi, S., Shibutani, M., 2019. Ameliorating effect of postweaning exposure to antioxidant on disruption of hippocampal neurogenesis induced by developmental hypothyroidism in rats. *J. Toxicol. Sci.* 44, 357–372.
<https://doi.org/10.2131/jts.44.357>

Tang, M., Alaniz, M.E., Felsky, D., Vardarajan, B., Reyes-Dumeyer, D., Lantigua, R., Medrano, M., Bennett, D.A., de Jager, P.L., Mayeux, R., Santa-Maria, I., Reitz, C., 2020. Synonymous

variants associated with Alzheimer disease in multiplex families. *Neurol Genet* 6, e450. <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000450>

Tarabeux, J., Kebir, O., Gauthier, J., Hamdan, F.F., Xiong, L., Piton, A., Spiegelman, D., Henrion, É., Millet, B., Fathalli, F., Joobert, R., Rapoport, J.L., DeLisi, L.E., Fombonne, É., Mottron, L., Forget-Dubois, N., Boivin, M., Michaud, J.L., Drapeau, P., Lafrenière, R.G., Rouleau, G.A., Krebs, M.-O., 2011. Rare mutations in N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in autism spectrum disorders and schizophrenia. *Transl Psychiatry* 1, e55–e55. <https://doi.org/10.1038/tp.2011.52>

Tarragon, E., Calleja-Conde, J., Giné, E., Segovia-Rodríguez, L., Durán-González, P., Echeverry-Alzate, V., 2021. Alcohol mixed with energy drinks: what about taurine? *Psychopharmacology* 238, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00213-020-05705-7>

Thaker, R., Oza, H., 2019. Correlation of Copper and Zinc in Spontaneous Abortion. *Int J Fertil Steril* 13, 5. <https://doi.org/10.22074/ijfs.2019.5586>

Toda, C., Santoro, A., Kim, J.D., Diano, S., 2017. POMC Neurons: From Birth to Death. *Annu. Rev. Physiol.* 79, 209–236. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034110>

Tremmel, M., Matzke, A., Albrecht, I., Laib, A.M., Olaku, V., Ballmer-Hofer, K., Christofori, G., Héroult, M., Augustin, H.G., Ponta, H., Orian-Rousseau, V., 2009. A CD44v6 peptide reveals a role of CD44 in VEGFR-2 signaling and angiogenesis. *Blood* 114, 5236–5244. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-04-219204>

Tsompanidis, A., Aydin, E., Padaigaitė, E., Richards, G., Allison, C., Hackett, G., Austin, T., Holt, R., Baron-Cohen, S., 2021. Maternal steroid levels and the autistic traits of the mother and infant. *Molecular Autism* 12, 51. <https://doi.org/10.1186/s13229-021-00453-7>

V

Vacher, C.-M., Lacaille, H., O'Reilly, J.J., Salzbank, J., Bakalar, D., Sebaoui, S., Liere, P., Clarkson-Paredes, C., Sasaki, T., Sathyanesan, A., Kratimenos, P., Ellegood, J., Lerch, J.P., Imamura, Y., Popratiloff, A., Hashimoto-Torii, K., Gallo, V., Schumacher, M., Penn, A.A., 2021. Placental endocrine function shapes cerebellar development and social behavior. *Nat Neurosci* 24, 1392–1401. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00896-4>

Vale W., Spiess J., Rivier C., Rivier J., 1981. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 213:1394–1397. <https://doi.org/10.1126/science.6267699>

- Varadinova, M., Boyadjieva, N., 2015. Epigenetic mechanisms: A possible link between autism spectrum disorders and fetal alcohol spectrum disorders. *Pharmacological Research* 102, 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.09.011>
- Vasquez, K., Kuizon, S., Junaid, M., Idrissi, A.E., 2013. The Effect of Folic Acid on GABAA-B 1 Receptor Subunit, in: El Idrissi, A., L'Amoreaux, W.J. (Eds.), *Taurine* 8, *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York, New York, NY, pp. 101–109. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6130-2_8
- Visser, W.E., Friesema, E.C.H., Visser, T.J., 2011. Minireview: Thyroid Hormone Transporters: The Knowns and the Unknowns. *Molecular Endocrinology* 25, 1–14. <https://doi.org/10.1210/me.2010-0095>

W

- Wald, N.J., Hackshaw, A.K., 2000. Advances in antenatal screening for Down Syndrome. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 14, 563–580. <https://doi.org/10.1053/beog.2000.0097>
- Wang, G.-S., Chang, N.-C., Wu, S.-C., Chang, A.C., 2002. Regulated expression of β 2B adrenoceptor during development. *Dev. Dyn.* 225, 142–152. <https://doi.org/10.1002/dvdy.10141>
- Wang, Q., Dong, X., Lu, J., Hu, T., Pei, G., 2020. Constitutive activity of a G protein-coupled receptor, DRD1, contributes to human cerebral organoid formation. *Stem Cells* 38, 653–665. <https://doi.org/10.1002/stem.3156>
- Washburn, S.E., Sawant, O.B., Lunde, E.R., Wu, G., Cudd, T.A., 2013. Acute alcohol exposure, acidemia or glutamine administration impacts amino acid homeostasis in ovine maternal and fetal plasma. *Amino Acids* 45, 543–554. <https://doi.org/10.1007/s00726-012-1453-1>
- Weedon-Fekjær, M.S., Taskén, K., 2012. Review: Spatiotemporal dynamics of hCG/cAMP signaling and regulation of placental function. *Placenta* 33, S87–S91. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.11.003>
- Wilens, T.E., 2004. Impact of ADHD and Its Treatment on Substance Abuse in Adults 8.
- Williams, G.R., 2008. Neurodevelopmental and Neurophysiological Actions of Thyroid Hormone. *Journal of Neuroendocrinology* 20, 784–794. <https://doi.org/10.1111/j.13652826.2008.01733.x>

- Williams, J.F., Smith, V.C., the COMMITTEE ON SUBSTANCE ABUSE, Levy, S., Ammerman, S.D., Gonzalez, P.K., Ryan, S.A., Siqueira, L.M., Smith, V.C., 2015. Fetal Alcohol Spectrum Disorders. *Pediatrics* 136, e1395–e1406. <https://doi.org/10.1542/peds.2015-3113>
- Wilson, E.S., Litwa, K., 2021. Synaptic Hyaluronan Synthesis and CD44-Mediated Signaling Coordinate Neural Circuit Development. *Cells* 10, 2574. <https://doi.org/10.3390/cells10102574>
- Winzer-Serhan, U.H., Leslie, F.M., 1997. α 2B Adrenoceptor mRNA expression during rat brain development. *Developmental Brain Research* 100, 90–100 [https://doi.org/10.1016/s0165-3806\(97\)00035-7](https://doi.org/10.1016/s0165-3806(97)00035-7)
- Wojcik-Baszko, D., Charkiewicz, K., Laudanski, P., 2018. Role of dyslipidemia in preeclampsia— A review of lipidomic analysis of blood, placenta, syncytiotrophoblast microvesicles and umbilical cord artery from women with preeclampsia. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 139, 19–23. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2018.09.006>
- Wolk, B.J., Ganetsky, M., Babu, K.M., 2012. Toxicity of energy drinks. *Current Opinion in Pediatrics* 24, 243–251. <https://doi.org/10.1097/MOP.0b013e3283506827>
- Woollett, L.A., 2011. Review: Transport of maternal cholesterol to the fetal circulation. *Placenta* 32, S218–S221. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.01.011>
- World Health Organization, 2021. Live life: an implementation guide for suicide prevention in countries. World Health Organization, Geneva.
- World Health Organization. Regional Office for South-East Asia, 2021. Preventing violence against children 2020: report for the WHO South-East Asia Region. World Health Organization. Regional Office for South-East Asia, New Delhi.
- Wu, X., Xie, C., Zhang, Y., Fan, Z., Yin, Y., Blachier, F., 2015. Glutamate–glutamine cycle and exchange in the placenta–fetus unit during late pregnancy. *Amino Acids* 47, 45–53. <https://doi.org/10.1007/s00726-014-1861-5>

X

- Xu, Y., Guo, W., Wang, Q., Lanzi, G., Luobu, O., Ma, X., Wang, Y., Zhen, P., Deng, W., Liu, Xiang, Zhuoma, B., Liu, Xie-he, Li, T., Hu, X., 2013. Polymorphisms of Genes in Neurotransmitter Systems Were Associated with Alcohol Use Disorders in a Tibetan Population. *PLoS ONE* 8, e80206. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080206>
- Xuei, X., Flury-Wetherill, L., Dick, D., Goate, A., Tischfield, J., Nurnberger Jr., J., Schuckit, M., Kramer, J., Kuperman, S., Hesselbrock, V., Porjesz, B., Foroud, T., Edenberg, H.J., 2010.

GABRR1 and GABRR2, encoding the GABA-A receptor subunits $\rho 1$ and $\rho 2$, are associated with alcohol dependence. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 153B, 418–427. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30995>

Y

- Yan, X., Lin, J., Talabattula, V.A.N., Mußmann, C., Yang, F., Wree, A., Rolfs, A., Luo, J., 2014. ADAM10 Negatively Regulates Neuronal Differentiation during Spinal Cord Development. *PLoS ONE* 9, e84617. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084617>
- Yang, B.-Z., Arias, A.J., Feinn, R., Krystal, J.H., Gelernter, J., Petrakis, I.L., 2017. GRIK1 and GABRA2 Variants Have Distinct Effects on the Dose-Related Subjective Response to Intravenous Alcohol in Healthy Social Drinkers. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 41, 2025–2032. <https://doi.org/10.1111/acer.13516>
- Yang, L., Wang, Y., Chen, P., Hu, J., Xiong, Y., Feng, D., Liu, H., Zhang, H., Yang, H., He, J., 2011. Na(+)/H(+) Exchanger Regulatory Factor 1 (NHERF1) Is Required for the Estradiol-Dependent Increase of Phosphatase and Tensin Homolog (PTEN) Protein Expression. *Endocrinology* 152, 4537–4549. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1207>

Z

- Zahr, N.M., Kaufman, K.L., Harper, C.G., 2011. Clinical and pathological features of alcohol-related brain damage. *Nat Rev Neurol* 7, 284–294. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2011.42>
- Zakhari, S., 2006. Overview: How Is Alcohol Metabolized by the Body? *Alcohol Res Health* 29, 245–254. PMC6527027
- Zheng, Y., Verhoeff, T.A., Perez Pardo, P., Garssen, J., Kraneveld, A.D., 2020. The Gut-Brain Axis in Autism Spectrum Disorder: A Focus on the Metalloproteases ADAM10 and ADAM17. *IJMS* 22, 118. <https://doi.org/10.3390/ijms22010118>
- Zhu, H., Peng, B., Klausen, C., Yi, Y., Li, Y., Xiong, S., von Dadelszen, P., Leung, P.C.K., 2020. NPFF increases fusogenic proteins syncytin 1 and syncytin 2 via GCM1 in first trimester primary human cytotrophoblast cells. *The FASEB Journal* 34, 9419–9432. <https://doi.org/10.1096/fj.201902978R>
- Zhu, Q., Huang, C., Meng, X., Li, J., 2019. CYP1A2 contributes to alcohol-induced abnormal lipid metabolism through the PTEN/AKT/SREBP-1c pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 513, 509–514. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.04.034>

Annexe

Annexe 1 : Table des amorces

Table des amorces hors plaques coatées	
RPLO	F 5'- AACATCTCCCCCTTCTCCT-3'
	R 5'-ACTCGTTTGTACCCGTTGAT-3'
RPL13	F 5' AAGGTCGTGCGTCTGAAG 3'
	R 5' GAGTCCGTGGGTCTTGAG 3'
SHDA	F 5' CCACCACTGCATCAAATTCATG 3'
	R 5' TGGGAACAAGAGGGCATCTG 3'
GCM1	F 5' CTGACAAGGCTTTTTTCTTCACA 3'
	R 5' CCAGACGGGACAGGTTT 3'
CD146	F 5'-GGGCCTCAGGCAACTTCA-3'
	R 5'-TTGGTGCACACGAAAATCA-3'

Annexe 2 : Table supplémentaire pour les voies de signalisation

Ingenuity Canonical Pathways	p-value	Ratio	z-score	Altered molecule
PI3K/AKT Signaling	7,41E-04	5,0%	-1,342	GRB2, GSK3A, IL6ST, ITGA2, ITGA2B, ITGA3, ITGAM, PDPK1, PPP2R5E, REL
ERK/MAPK Signaling	1,45E-02	3,7%	0,447	BCAR1, GRB2, ITGA2, ITGA2B, ITGA3, ITGAM, PPP2R5E, RPS6KA5
Growth Hormone Signaling	6,60E-03	5,6%	0	IGFALS, PDPK1, RPS6KA5, STAT5A
LXR/RXR Activation	1,38E-05	8,1%	-2,828	A1BG, APOA1, APOA4, APOC1, FDFT1, GC, RBP4, REL, SERPINF1, TF
PPARα/RXRα	4,94E-02	2,5%	-1	ACAA1, APOA1, GPD2, GRB2, REL
Fatty Acid Metabolism	1,12E-02	5,1%	0	ACAA1, ACADSB, ACSL4, ACSL5, ALDH1B1, AUH
mTOR signaling	6.23E-03	3,8%	0.447	PDPK1, PLD3, PPP2R5E, RPS6KA5, RPS16, MLST8, DGKZ, EIF4EBP2

Annexe 3 : Légende IPA d'Ingenuity

IPA Legend

This legend provides a key to the main features of Network Explorer, My Pathways, and Canonical Pathways, including molecule shapes and colors as well as relationship labels and types.

Node Shapes

Network Shapes	Path Designer Shapes
Canonical Pathway	Canonical Pathway
Complex/Group/Other	Complex/Group/Other
Chemical/Drug/Toxicant	Chemical/Toxicant
Cytokine	Cytokine
Disease	Disease
Enzyme	Enzyme
Function	Function
Fusion gene/product	Fusion gene/product
G-protein Coupled Receptor	G-protein Coupled Receptor
Growth Factor	Growth Factor
Ion Channel	Ion Channel
Kinase	Kinase
Ligand-dependent Nuclear Receptor	Ligand-dependent Nuclear Receptor
Mature microRNA	Mature microRNA
microRNA	microRNA
Other	Other
Peptidase	Peptidase
Phosphatase	Phosphatase
Transcription Regulator	Transcription Regulator
Translation Regulator	Translation Regulator
Transmembrane Receptor	Transmembrane Receptor
Transporter	Transporter

Other molecule symbols:

Degraded protein (shown only in Canonical Pathways)

MAP Prediction Legend

Prediction Legend

more extreme in dataset less

Increased measurement

Decreased measurement

more confidence less

Predicted activation

Predicted inhibition

Glow indicates activity when opposite of measurement

Predicted Relationships

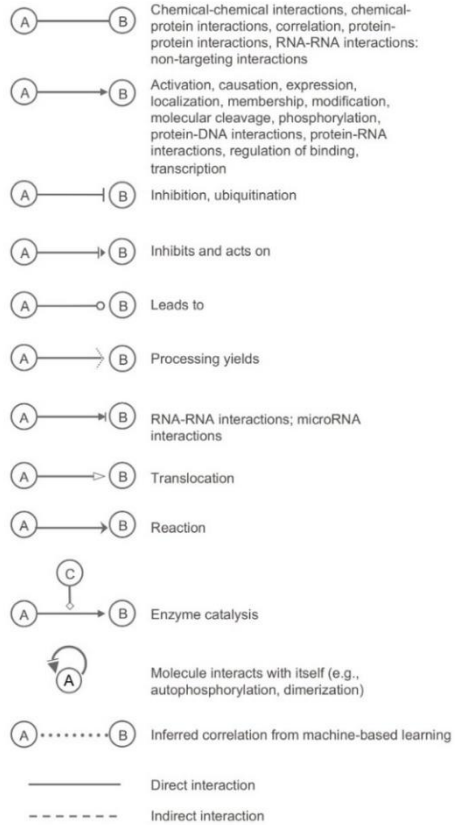
Leads to activation

Leads to inhibition

Findings inconsistent with state of downstream molecule

Effect not predicted

Relationship line descriptions



Interpretation of MAP relationship lines in networks/pathways

The coloring and type of relationship lines will often be modified when MAP predictions are applied, as outlined in the table below:

Upstream molecule's predicted activity	Downstream molecule's activity	Consistency of Findings with state of downstream molecule	Relationship line coloring and type
Activated	Increased	Consistent	Orange activation
Inhibited	Decreased	Consistent	Blue activation
Activated	Decreased	Consistent	Blue inhibition
Inhibited	Increased	Consistent	Orange inhibition
Activated	Increased	Inconsistent	Yellow inhibition
Inhibited	Decreased	Inconsistent	Yellow inhibition
Activated	Decreased	Inconsistent	Yellow activation
Inhibited	Increased	Inconsistent	Yellow activation

Molecule outline colors and decorations on networks and pathways

- Default outline color
- Selected (click outside of node to de-select)
- Highlighted (right click and choose "reset highlight" to remove highlight)
- Number of isoforms (splice variant transcripts) in overlaid expression dataset. Hide these badges in the Overlay > Analyses, Datasets & Lists menu
- Number of phospho sites in overlaid phosphoproteomics dataset

Annexe 4 : Préparation du gradient de percoll

Gradient Percoll 50 mL

Solution initiale 90% : $\left\{ \begin{array}{l} 45 \text{ mL Percoll pur} \\ 5 \text{ mL HBSS } \times 10 \times \end{array} \right.$

14 tubes

Solution Percoll		HBSS 1X		% final
<u>volume final</u>		<u>volume final</u>		
5 mL	10 mL	5 mL	10 mL	
3,6 mL	7,2 mL 90 %	1,4 mL	2,8 mL	65 %
2,5 mL	5 mL 90 %	2,5 mL	5 mL	45 %
7,8 mL	15,6 mL 90 %	2,2 mL	4,4 mL	70 %
5 mL	10 mL 70 %	5 mL	10 mL	35 %
5,6 mL	11,2 mL 90 %	4,4 mL	8,8 mL	50 %
5 mL	10 mL 50 %	5 mL	10 mL	25 %
4,5 mL	9 mL 90 %	5,5 mL	11 mL	40 %
5 mL	10 mL 40 %	5 mL	10 mL	20 %
5 mL	10 mL 20 %	5 mL	10 mL	10 %
5 mL	10 mL 10 %	5 mL	10 mL	5 %
6,7 mL	13,4 mL 90 %	3,3 mL	6,6 mL	60 %
5 mL	10 mL 60 %	5 mL	10 mL	30 %
5 mL	10 mL 30 %	5 mL	10 mL	15 %
3 mL	6 mL 90 %	2 mL	4 mL	55 %

Liste des figures

FIGURE 1	VOIE METABOLIQUE DE L'ALCOOL MODIFIEE D'APRES V. LAFOREST BERARD, 1995.....	120
FIGURE 2	CONCENTRATION D'ALCOOL DANS L'HALEINE. D'APRES LA FIGURE DE M. MACKUS ET AL. 2000. (L'ECART TYPE (SE) DES DIFFERENTES CONCENTRATIONS EST MONTREE.)	122
FIGURE 3	REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA FORMATION DU BLASTOCYTE ET SON ATTACHEMENT A LA MUQUEUSE UTERINE. LE ZYGOTE VA SE DIVISER PROGRESSIVEMENT POUR FORMER LE BLASTOCYTE (A J5) PUIS S'ATTACHER A L'ENDOMETRE A PARTIR DE J6 PAR SON POLE EMBRYONNAIRE (ILLUSTRATION EN BAS A GAUCHE). AU 7 ^E JOURS LE SYNCYTIOTROPHBLASTE PENETRE L'ENDOMETRE MATERNEL POUR S'Y ENFOUIR. MODIFIE D'APRES "THE DEVELOPING HUMAN: CLINICALLY ORIENTED EMBRYOLOGY" PAR MOORE K.L., PERSAUD T.V.N, TORCHIA M.G. (EDITION ORIGINALE 2016).....	126
FIGURE 4	ETAPES DE DEVELOPPEMENT DE LA PERIODE EMBRYONNAIRE. DE LA 3 ^E SEMAINE JUSQU'A LA 8 ^E SEMAINE. MODIFIE D'APRES « THE DEVELOPING HUMAN: CLINICALLY ORIENTED EMBRYOLOGY » PAR MOORE K.L., PERSAUD T.V.N, TORCHIA M.G. (EDITION ORIGINALE 2016).....	127
FIGURE 5	PROFIL D'UNE ENFANT PRESENTANT LES 3 CARACTERISTIQUES FACIALES DIAGNOSTIQUEES PAR WILLIAMS JANET F., SMITH VINCENT C. DU SYNDROME D'ALCOOLISME FETAL. ©DESSINE PAR JESSICA DALMASSO	131
FIGURE 6	VUE D'ENSEMBLE DE LA NEURULATION (MODIFIE D'APRES DEUX ETUDES MENEES SUR LA NEURULATION)– A-B-C REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA NEURULATION AVEC DANS L'ORDRE CHRONOLOGIQUE A- LA FORMATION DE LA GOUTTIERE NEURALE PAR LE FEUILLET ECTODERMIQUE, B- LES BORDS DE LA GOUTTIERE NEURALE SE REPLIENT POUR FORMER LE TUBE NEURAL ET C- LE TUBE NEURAL SE REFERME PAR FUSION DES CELLULES DE L'ECTODERME. DLHP= DORSOLATERAL HINGE POINT ; MHP=MEDIAN HINGE POINT; NC =NOTOCHORD; NE= NEUROEPITHELIUM; NNE= NON-NEURAL ECTODERM; PM= PARAXIAL MESODERM (NIKOLOPOULOU E. ET AL. 2017). LES IMAGES A,B,C CORRESPONDENT A DES IMAGES PRISES EN MICROSCOPIE A FLUORESCENCE DE LA FORMATION DU TUBE NEURAL (SELON LE MEME SCHEMA QUE A-B-C) D'UN MODELE DE CELLULES SOUCHES EN CULTURE 2D CARACTERISE PAR KARZBRUN, E. ET AL. 2021 – SCALE BARS : 50µM	135
FIGURE 7	REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA DIFFERENCIATION DU CERVEAU. A VUE DE DESSUS DES 3 VESICULES PRIMITIVES B- DIFFERENCIATION DU TELEENCEPHALE. MODIFIE D'APRES « NEUROSCIENCES,EXPLORING THE BRAIN » PAR BEAR M.F., CONNORS B.W., PARADISO M.A. (EDITION FRANÇAISE-2013).....	136
FIGURE 8	LE PLACENTA HUMAIN, PHOTOGRAPHIE CREDIT J. DALMASSO, 2016 A GAUCHE (A) LA FACE FETALE TAPISSEE PAR L'AMNIOS QUI RELIE LE PLACENTA AU FETUS PAR LE CORDON OMBILICAL ; A DROITE (B) LA FACE MATERNELLE COMPOSEE DES COTYLEDONS RECOUVERTS DE LA CADUQUE BASALE ET QUI EST ANCRÉE DANS L'UTERUS MATERNEL.	141
FIGURE 9	REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UNE COUPE TRANSVERSE DE PLACENTA HUMAIN A TERME. D'APRES "THE DEVELOPING HUMAN: CLINICALLY ORIENTED EMBRYOLOGY" PAR MOORE K.L., PERSAUD T.V.N, TORCHIA M.G. (EDITION ORIGINALE 2016)	142
FIGURE 10	REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTES ETAPES DU DEVELOPPEMENT DU PLACENTA HUMAIN D'APRES « PATHOLOGY OF THE HUMAN PLACENTA » DE BENIRSCHKE ET KAUFMAN (2000) BP : PLAQUE BASALE, CP : PLAQUE CHORIALE, CT CYTOTROPHBLASTE, ST : SYNCYTIOTROPHBLASTE, D : DECIDUE, G : CELLULES GEANTES, VE : VAISSEAU ENDOMETRIAL, X : TROPHBLASTE EXTRAVILLEUX, L : LACUNES DE SANG MATERNEL	143
FIGURE 11	REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UNE VILLOSITE DANS L'ESPACE INTERVILLEUX. CELLE-CI EST COMPOSEE D'UN AXE MESENCHYMATEUX QUI CONTIENT LES CAPILLAIRES FETAUX ET EST BORDEE DE CELLULES TROPHBLASTIQUES MONONUCLEES (LES CYTOTROPHBLASTES CT) ET MULTINUCLEES (LES SYNCYTIOTROPHBLASTES ST). LA VILLOSITE BAIGNE DANS LE SANG	

MATERNEL QUI PROVIENT DES ARTERES UTERINES SPIRALEES. MODIFIE D'APRES LE PLACENTA HUMAIN, D'EVAIN-BRION 2010.	144
FIGURE 12 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU DEVELOPPEMENT DU PLACENTA ET DU FŒTUS ENTRE LA 5 ^E ET LA 22 ^E SEMAINE DE GROSSESSE. D'APRÈS "THE DEVELOPING HUMAN: CLINICALLY ORIENTED EMBRYOLOGY" PAR MOORE K.L., PERSAUD T.V.N, TORCHIA M.G. (ÉDITION ORIGINALE 2016)	145
FIGURE 13 REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UNE VILLOSITE CHORIALE A PARTIR DE LA 10 ^E SEMAINE DE GROSSESSE ET SON RENOUVELLEMENT. D'APRÈS "THE DEVELOPING HUMAN: CLINICALLY ORIENTED EMBRYOLOGY" PAR MOORE K.L., PERSAUD T.V.N, TORCHIA M.G. (ÉDITION ORIGINALE 2016).....	146
FIGURE 14 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA FUSION DES CYTOTROPHOBLASTES EN SYNCYTIOTROPHOBLASTES TELLE QU'OBSERVEE EN CULTURE PRIMAIRE DE CTV AINSI QUE LES ACTEURS MOLECULAIRES IMPACTANT CETTE FUSION. MODIFIE D'APRES GERBAUD, P. ET PIDOUX G. (2015). LES IMAGES EN FLUORESCENCE DE CTVS A 24H ET ST A 72H MONTRE LA FUSION ENTRE 24H ET 72H DE CULTURE DE CTV D'UN MEME PLACENTA INCUBE DANS DU MILIEU COMPLET. CREDIT PHOTO JESSICA DALMASSO.....	147
FIGURE 15 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU METABOLISME PLACENTAIRE, MODIFIE D'APRES WU XIN ET AL. 2015 ET IRVING ET AL,2021.....	157
FIGURE 16 RESUME DES EFFETS DE L'ALCOOL IN UTERO SUR LE PLACENTA ET LE CERVEAU FŒTAL DE SOURIS (LECUYER M. ET AL. 2017).A) CORRESPOND AUX EFFETS OBSERVES DANS LE PLACENTA EXPOSE OU NON A L'ALCOOL IN UTERO. B) CORRESPOND AUX EFFETS OBSERVES DANS LE CERVEAU FŒTAL POST DELIVRANCE, EXPOSE OU NON A L'ALCOOL IN UTERO (EN LIEN DIRECT AVEC LES EFFETS OBSERVES DANS LE PLACENTA).....	160
FIGURE 17 REPARTITION DES PRELEVEMENTS PLACENTAIRES DU 1ER OU TROISIEME TRIMESTRE EN FONCTION DES EXPERIMENTATIONS EFFECTUEES SUR LES DIFFERENTS TISSUS.	172
FIGURE 18 POSTE DE TRAVAIL POUR LA PERFUSION PLACENTAIRE. LA CHAINE DE PERFUSION EST COMPOSEE D'UN BAIN MARIE CHAUFFANT LES 2 SOLUTION DE PERFUSAT FŒTAL ET MATERNEL. CELLES-CI SONT ACHEMINEES AU PLACENTA PAR DES TUBULURES ET LE DEBIT EST CONTROLE PAR LA POMPE PERISTALTIQUE. LA CHAMBRE DE PERFUSION PLACENTAIRE EST CHAUFFEE A 37°C, LE PLACENTA Y EST DEPOSE FACE FŒTALE PERFUSEE VERS LE BAS ET FACE MATERNELLE CATHELONNEE VERS LE HAUT. LES ELUATS FŒTAL ET MATERNEL SONT RECUPERES DANS DIFFERENTS TUBES.....	175
FIGURE 19 – REPARTITION SCHEMATIQUE DES EXPLANTS VILLOSITAIRES DANS LA BOITE 24 PUIITS. 3 CONDITIONS ONT ETE ETUDIEES (CONTROLE (SVF), 0.5G/L (SVF+ [0.5G/L] ETOH) ET 2G/L (SVF+[2G/L] ETOH)). POUR CHAQUE CONDITION, UNE FOIS LE TRAITEMENT TERMINE LES VILLOSITES ONT ETE CONSERVEES COMME DECRIT SUR LE SCHEMA EN VUE D'ANALYSES FONCTIONNELLES.....	178
FIGURE 20 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTES ETAPES ESSENTIELLES DE L'ISOLEMENT DES CVT POUR LA CULTURE CELLULAIRE PRIMAIRE.	180
FIGURE 21 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTES ETAPES DE FIXATIONS, IMMUNOMARQUAGES, ACQUISITIONS ET TRAITEMENT DES DONNEES DE LA TECHNIQUE D'INDEX DE FUSION DES CYTOTROPHOBLASTES.	183
FIGURE 22 – PROGRAMME D'AMPLIFICATION REALISE PAR LE THERMOCYCLEUR BIORAD™ DE LA QPCR.	187
FIGURE 23 COURBES D'AMPLIFICATION (A), DE DISSOCIATION (B) ET PIC DE DISSOCIATION (C) GENERE PAR LE LOGICIEL CFX MAESTRO POUR VALIDATION DES RESULTATS DE LA QPCR.	188

FIGURE 24 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES LONGUEURS D'ONDES UTILISEES POUR NOS ANALYSES SUR LE MICROSCOPE LEICA SP8. 196

FIGURE 25 EFFECT OF ALCOHOL IN VITRO ON LACTATE DEHYDROGENASE (LDH) SECRETION. PLACENTAS CONTROL N=5; (A) GRAPHICAL REPRESENTATION OF SECRETION OF LDH (UI/L)/10⁶CELLS BY VCT'S PRIMARY CULTURE FOR 24H-48H OR 72H OF INCUBATION WITH SVF MEDIUM (●) OR ETHANOL TREATMENT [0.5G/L] (□), [2G/L] (⊙) (SUPPLEMENTED IN SVF MEDIUM). CULTURE MEDIUM OF EACH CONDITION WERE COLLECTED EVERY DAY AND LDH WAS MEASURED BY AUTOMATE ON THE COCHIN HOSPITAL PLATFORM. (B) GRAPHICAL REPRESENTATION OF SECRETION OF LDH (UI/L) BY VILLI INCUBATED WITH SVF MEDIUM. THE SIX FIRST DAY, MEDIUM WAS COLLECTED AND CHANGE EVERY DAY. AT THE 6TH DAY, FOR THE SYNCYTIUM RENEWAL, VILLI WERE INCUBATED WITH SVF MEDIUM OR TREATMENT [0.5G/L], [2G/L] OF ETHANOL, FOR 24H OR 48H. CULTURE MEDIUM WERE COLLECTED AND LDH WAS MEASURED BY AUTOMATE ON THE COCHIN HOSPITAL PLATFORM. STATISTICAL TEST: ANOVA TWO WAY + SIDAK'S MULTIPLE COMPARISONS TEST AND DUNNETT'S MULTIPLE COMPARISONS TEST WERE MADE WITH GRAPH PAD® PRISM 7.0 SOFTWARE; P-VALUE> 0.05. 201

FIGURE 26 EFFECT OF ALCOHOL IN VITRO ON SECRETION OF HCG (HUMAN CHORIONIC GONADOTROPHIN) IN VITRO . VILLI AND CELLS WERE INCUBATED WITH SVF MEDIUM (●) OR ETHANOL TREATMENT [0.5G/L] (□), [2G/L] (⊙); (A) GRAPHICAL REPRESENTATION OF SECRETION OF HCG (UI/L)/10⁶CELLS BY VCT'S PRIMARY CULTURE FOR 24H-48H OR 72H OF INCUBATION WITH SVF MEDIUM OR ETHANOL TREATMENT [0.5G/L], [2G/L]. CULTURE MEDIUM OF EACH CONDITION WERE COLLECTED AND HCG CONCENTRATION WAS MEASURED BY AUTOMATE ON THE COCHIN HOSPITAL PLATFORM. (B) GRAPHICAL REPRESENTATION OF SECRETION OF HCG (UI/L) BY VILLI INCUBATED WITH SVF MEDIUM. THE SIX FIRST DAY, MEDIUM WAS COLLECTED AND CHANGE EVERY DAY. AT THE 6TH DAY, FOR THE SYNCYTIUM RENEWAL, VILLI WERE INCUBATED WITH SVF MEDIUM OR ETHANOL TREATMENT [0.5G/L], [2G/L] FOR 24H OR 48H. CULTURE MEDIUM WERE COLLECTED AND HCG WAS MEASURED BY AUTOMATE ON THE COCHIN HOSPITAL PLATFORM. STATISTICAL TEST: ANOVA TWO WAY + TUKEY'S MULTIPLE COMPARISONS TEST WERE MADE WITH GRAPH PAD® PRISM 7.0 SOFTWARE; P-VALUE> 0.05; P-VALUE ≤ 0.05 (*); P-VALUE ≤ 0.01 (**); P-VALUE ≤ 0.001 (***); P-VALUE ≤ 0.0001 (****). STATISTICAL RESULT: A) CONTROL 24HVS72H= ***; [0.5G/L] 24HVS72H= ***; [2G/L]= 24HVS72H=** B) THERE IS NO SIGNIFICANT RESULT WITH ANOVA TWO WAY BECAUSE OF BIG SD. 202

FIGURE 27- EFFECT OF ALCOHOL IN VITRO PROGESTERONE (PG) SECRETION. PLACENTAS CONTROL N=5; (A) GRAPHICAL REPRESENTATION OF SECRETION OF PG (UI/L)/10⁶CELLS BY VCT'S PRIMARY CULTURE FOR 24H-48H OR 72H OF INCUBATION WITH SVF MEDIUM (●) OR ETHANOL TREATMENT [0.5G/L] (□), [2G/L] (⊙) (SUPPLEMENTED IN SVF MEDIUM). CULTURE MEDIUM OF EACH CONDITION WERE COLLECTED EVERY DAY AND PG WAS MEASURED BY AUTOMATE ON THE COCHIN HOSPITAL PLATFORM. (B) GRAPHICAL REPRESENTATION OF SECRETION OF PG (UI/L) BY VILLI INCUBATED WITH SVF MEDIUM. THE SIX FIRST DAY, MEDIUM WAS COLLECTED AND CHANGE EVERY DAY. AT THE 6TH DAY, FOR THE SYNCYTIUM RENEWAL, VILLI WERE INCUBATED WITH SVF MEDIUM OR TREATMENT [0.5G/L], [2G/L] OF ETHANOL, FOR 24H OR 48H. CULTURE MEDIUM WERE COLLECTED AND PG WAS MEASURED BY AUTOMATE ON THE COCHIN HOSPITAL PLATFORM. STATISTICAL TEST: ANOVA TWO WAY + SIDAK'S MULTIPLE COMPARISONS TEST AND DUNNETT'S MULTIPLE COMPARISONS TEST WERE MADE WITH GRAPH PAD® PRISM 7.0 SOFTWARE; P-VALUE> 0.05. 204

FIGURE 28 EFFECT OF ACETALDEHYDE IN VITRO ON SECRETION'S FUNCTION OF VCT'S CELLS. (A) GRAPHICAL REPRESENTATION OF SECRETION OF HCG (UI/L)/10⁶CELLS BY VCT'S PRIMARY CULTURE FOR 24H-48H OR 72H OF INCUBATION WITH TREATMENT OR SVF MEDIUM. CULTURE MEDIUM OF EACH CONDITION WERE COLLECTED AND HCG WAS MEASURED BY AUTOMATE ON THE

COCHIN HOSPITAL PLATFORM. ●: CONTROL (SVF MEDIUM); ■: ACETALDEHYDE [5μM]; ▲: ACETALDEHYDE [10μM]; ▲: ACETALDEHYDE [50μM]. (B) GRAPHICAL REPRESENTATION OF SECRETION OF PG (NMOL/L)/10⁶CELLS BY VCT'S PRIMARY CULTURE FOR 24H-48H OR 72H OF INCUBATION WITH TREATMENT OR SVF MEDIUM. CULTURE MEDIUM OF EACH CONDITION WERE COLLECTED AND HCG WAS MEASURED BY AUTOMATE ON THE COCHIN HOSPITAL PLATFORM. ●: CONTROL (SVF MEDIUM); ■: ACETALDEHYDE [5μM]; ▲: ACETALDEHYDE [10μM]; ▲: ACETALDEHYDE [50μM]. C) GRAPHICAL REPRESENTATION OF SECRETION OF LDH (U/L)/10⁶CELLS BY VCT'S PRIMARY CULTURE FOR 24H-48H OR 72H OF INCUBATION WITH TREATMENT OR SVF MEDIUM. CULTURE MEDIUM OF EACH CONDITION WERE COLLECTED AND HCG WAS MEASURED BY AUTOMATE ON THE COCHIN HOSPITAL PLATFORM. ●: CONTROL (SVF MEDIUM); ■: ACETALDEHYDE [5μM]; ▲: ACETALDEHYDE [10μM]; ▲: ACETALDEHYDE [50μM]. STATISTICAL TEST: ANOVA TWO WAY + SIDAK'S MULTIPLE COMPARISONS TEST AND TUKEY'S MULTIPLE COMPARISONS TEST WERE MADE WITH GRAPH PAD® PRISM 7.0 SOFTWARE; P-VALUE > 0.05; P-VALUE ≤ 0.05 (*); P-VALUE ≤ 0.01 (**); P-VALUE ≤ 0.001 (***). STATISTICAL RESULT: A) CONTROL 24HVS72H= ***, 48HVS72H=*; [5μM] 24HVS72H= **, [10μM] 24HVS72H=***; [50μM] 24HVS72H= ***, 48HVS72H=* . B) CONTROL 24HVS72H= **, [5μM] 24HVS72H= **, [10μM] 24HVS72H= **, [50μM] 24HVS72H= **..... 205

FIGURE 29 VALIDATION OF PERFUSION FOR SECRETOME ANALYSIS A) FOETAL TRANSFER RATE OF ANTIPYRINE (ATP); ATP IS ADDED IN MOTHER'S SOLUTION AND USED FOR CHECK THE PASSAGE OF PERFUSION ACROSS THE PLACENTAL BARRIER (FROM MOTHER TO FOETUS); PLACENTAS WERE COLLECTED FROM CONTROL MOTHER AT TERM OF PREGNANCY (VAGINAL DELIVERY) AND PERFUSED WITH EARL'S SOLUTION (PHYSIOLOGICAL SOLUTION)+ATP WITH [2G/L]EtOH (●: ALCOHOL N=5) OR WITHOUT ALCOHOL (●: CONTROL N=5). ATP CONCENTRATION OF MATERNAL ELUATE AND FOETAL ELUATE WERE MEASURED BY HPLC AND TTF WAS CALCULATED BY THE FORMULA: $TTF = \frac{\text{FOETAL CONCENTRATION OF ATP}}{\text{MATERNAL CONCENTRATION OF ATP}} \times 100$. STATISTICAL TEST: MULTIPLE T-TEST COMPARISONS WERE MADE WITH GRAPH PAD® PRISM 7.0 SOFTWARE; P-VALUE >0.05; P-VALUE ≤ 0.05 (*). B) SCHEMATIC REPRESENTATION OF UNSUPERVISED ANALYSIS INTO PRINCIPAL COMPONENTS ANALYSIS (PCA) WITH PERSEUS SOFTWARE. THE SOFTWARE IS ASKED TO SELECT THE SAMPLES BLINDLY ACCORDING TO THE PERCENTAGE OF PROTEINS PRESENT IN EACH SAMPLE. IN AN UNSUPERVISED WAY, THE SOFTWARE TELLS US THAT WHEN WE CROSS THE 2 MAIN COMPONENTS (COMPONENT 1 = 42.6% OF THE PROTEINS ANALYSED IN THE SAMPLE; COMPONENT 2 = 16.5% OF THE PROTEINS ANALYSED IN THE SAMPLE) WE FIND 2 GROUPS OF SAMPLES ARE DISTINCT ■: CONTROL N=5; □ ALCOHOL N=5; SOFTWARE TELLS US THAT 2 GROUPS REPRESENT 42.6% OF THE PROTEINS ANALYSED: ○ = PLACENTA CONTROL; ○ = PLACENTA ALCOHOL..... 206

FIGURE 30 SCHEMATIC REPRESENTATION OF UNSUPERVISED PROTEOMIC ANALYSIS INTO PRINCIPAL COMPONENTS ANALYSIS (PCA) WITH PERSUEUS SOFTWARE. THE SOFTWARE IS ASKED TO SELECT THE SAMPLES BLINDLY ACCORDING TO THE PERCENTAGE OF PROTEINS PRESENT IN EACH SAMPLE. IN AN UNSUPERVISED WAY, THE SOFTWARE TELLS US THAT WHEN WE CROSS THE 2 MAINS COMPONENTS (COMPONENT 1 = 20.7% OF THE PROTEINS ANALYSED IN THE SAMPLE; COMPONENT 2 = 10.2% OF THE PROTEINS ANALYSED IN THE SAMPLE) WE FIND 4 GROUPS OF SAMPLES ARE DISTINCT (A): ■: CONTROL N=5; □ ALCOHOL N=5; □ EARLY ABORTION N=5; □ LATE ABORTION N=5; (B) JUST LOOK AT THE 2ND COMPONENT, SOFTWARE TELLS US THAT 2 GROUPS REPRESENT 10.2% OF THE PROTEINS ANALYSED: ○ = ALCOHOL + EARLY ABORTION; ○ = CONTROL + LATER ABORTION..... 207

FIGURE 31: IN VIVO EFFECT OF ALCOHOL ON FUSION INDEX OF IN VITRO VCT'S CULTURE. TROPHOBLAST'S FUSION INDEX ARE MEASURED USING IMMUNOCYTOCHEMISTRY ASSAY. CELLS WERE LABELLED WITH DAPI [20MG/ML] AND DSK



(DESMOPLAKINE) [0.05MG/ML]. (A) GRAPHICAL REPRESENTATION OF FUSION INDEX IN VCT'S PRIMARY CULTURE INCUBATE FOR 24H-48H OR 72H WITH SVF MEDIUM. FIS WERE CALCULATED WITH THE FORMULA $FI = ((NUCLEI \text{ NUMBER IN ST}) - (\text{TOTAL COUNT OF SYNCYTIUM})) / (\text{NUMBER TOTAL OF NUCLEUS IN THE PICTURE})$. CT AND ST WERE COUNTED MANUALLY WITH IMAGEJ SOFTWARE.  : CONTROL N=8;  : ALCOHOL N=6. STATISTICAL TEST: ANOVA TWO WAY + SIDAK'S MULTIPLE COMPARISONS TEST WERE MADE WITH GRAPH PAD® PRISM 7.0 SOFTWARE; P-VALUE > 0.05; P-VALUE ≤ 0.05 (*); P-VALUE ≤ 0.01 (**); P-VALUE ≤ 0.001 (***) ; P-VALUE ≤ 0.0001 (****). STATISTICAL RESULT: ALCOHOL VS CONTROL 24H= *; ALCOHOL VS CONTROL 48H= ****; ALCOHOL VS CONTROL 72H= ***. (B) PICTURES OF CELLS FIXED WITH METHANOL AND LABELLED WITH DAPI (BLUE) AND DSK (DESMOPLAKINE)(GREEN) AT 24H-48H OR 72H OF TROPHOBLAST CELLS INCUBATED WITH CULTURE MEDIUM. PICTURES WERE TAKEN WITH FLUORESCENCE MICROSCOPE X40 AND TREATED BY VISION® STAGE-FLUO SOFTWARE AND IMAGEJ SOFTWARE..... 210




FIGURE 32 IN VIVO AND IN VITRO EFFECT OF ALCOHOL ON FUSION INDEX OF IN VITRO VCT'S CULTURE. TROPHOBLAST'S FUSION INDEX ARE MEASURED USING IMMUNOCYTOCHEMISTRY ASSAY. CELLS WERE LABELLED WITH DAPI [20MG/ML] AND DSK (DESMOPLAKINE) [0.05MG/ML]. (A) PICTURES OF CELLS FIXED WITH METHANOL AND LABELLED WITH DAPI (BLUE) AND DSK (DESMOPLAKINE)(GREEN) AT 24H-48H OR 72H OF TROPHOBLAST CELLS INCUBATED WITH CULTURE MEDIUM AND ALCOHOL AT [0.5G/L] OR [2G/L] WAS ADDED. THE TWO GROUPS OF ALCOHOL (MILD AND SEVERE) ARE SEPARATED FOR INVESTIGATE THE EFFECT OF CHRONIC ALCOHOLISM. (A) GRAPHICAL REPRESENTATION OF FUSION INDEX IN VCT'S PRIMARY CULTURE INCUBATE FOR 24H-48H OR 72H WITH CULTURE MEDIUM AND ALCOHOL AT [0.5G/L] OR [2G/L]. FIS WERE CALCULATED WITH THE FORMULA $FI = ((NUCLEI \text{ NUMBER IN ST}) - (\text{TOTAL COUNT OF SYNCYTIUM})) / (\text{NUMBER TOTAL OF NUCLEUS IN THE PICTURE})$. CT AND ST WERE COUNTED MANUALLY WITH IMAGEJ SOFTWARE.  : CONTROL N=8;  : MILD ALCOHOL N=2  : SEVERE ALCOHOL N=4. STATISTICAL TEST: VARIANCE ANALYSES AND POST HOC TEST WERE MADE BY A VARIANCE ANALYSIS SOFTWARE. P-VALUE > 0.05. 211





FIGURE 33: EFFECT OF IN VIVO ALCOHOL ON SECRETION OF HCG (HUMAN CHORIONIC GONADOTROPHIN HORMONE) IN VITRO  : CONTROL N=8;  : ALCOHOL N=5. (A) GRAPHICAL REPRESENTATION OF SECRETION OF HCG (UI/L)/10⁻⁶CELLS BY VCT'S PRIMARY CULTURE FOR 24H-48H OR 72H OF INCUBATION WITH SVF MEDIUM. CULTURE MEDIUM OF EACH CONDITION WERE COLLECTED AND HCG WAS MEASURED BY AUTOMATE ON THE COCHIN HOSPITAL PLATFORM. (B) GRAPHICAL REPRESENTATION OF SECRETION OF HCG (UI/L) BY VILLI INCUBATED WITH SVF MEDIUM. THE SIX FIRST DAY, MEDIUM WAS COLLECTED AND CHANGE EVERY DAY. AT THE 6TH DAY, FOR THE SYNCYTIUM RENEWAL, VILLI WERE INCUBATED WITH SVF FOR 24H OR 48H. CULTURE MEDIUM WERE COLLECTED AND HCG WAS MEASURED BY AUTOMATE ON THE COCHIN HOSPITAL PLATFORM. STATISTICAL TEST: ANOVA TWO WAY + SIDAK'S MULTIPLE COMPARISONS TEST WERE MADE WITH GRAPH PAD® PRISM 7.0 SOFTWARE; P-VALUE > 0.05; P-VALUE ≤ 0.05 (*); P-VALUE ≤ 0.01 (**); P-VALUE ≤ 0.001 (***) ; P-VALUE ≤ 0.0001 (****). STATISTICAL RESULT: A) ALCOHOL VS CONTROL 24H= NS; ALCOHOL VS CONTROL 48H=*; ALCOHOL VS CONTROL 72H=****. B) WITH ANOVA TWO WAY+ SIDAK'S MULTIPLE COMPARISON TEST ONLY ALCOHOL VS CONTROL SVF48H ARE SIGNIFICANT=***; WITH MULTIPLE T-TEST + ASSUME CONSISTENT SD (A= 0.05%) ALCOHOL VS CONTROL 24H SVF ARE SIGNIFICANT TOO = * (0.015); ALCOHOL VS CONTROL 48H SVF= ****. 212

FIGURE 34 EFFECT OF IN VIVO ALCOHOL ON SECRETION OF PG (PROGESTERONE) IN VITRO  : CONTROL N=8;  : ALCOHOL N=5. (A) GRAPHICAL REPRESENTATION OF SECRETION OF PG (NMOL/L)/10⁻⁶CELLS BY VCT'S PRIMARY CULTURE FOR 24H-48H OR 72H OF INCUBATION WITH SVF MEDIUM. CULTURE MEDIUM OF EACH CONDITION WERE COLLECTED, AND PG WAS MEASURED BY AUTOMATE ON THE COCHIN HOSPITAL PLATFORM. (B) GRAPHICAL REPRESENTATION OF SECRETION OF PG

(NMOL/L) BY VILLI INCUBATED WITH SVF MEDIUM. THE SIX FIRST DAY, MEDIUM WAS COLLECTED AND CHANGE EVERY DAY. AT THE 6TH DAY, FOR THE SYNCYTIUM RENEWAL, VILLI WERE INCUBATED WITH SVF FOR 24H OR 48H. CULTURE MEDIUM WERE COLLECTED, AND PG WAS MEASURED BY AUTOMATE ON THE COCHIN HOSPITAL PLATFORM. STATISTICAL TEST: ANOVA TWO WAY + SIDAK'S MULTIPLE COMPARISONS TEST WERE MADE WITH GRAPH PAD[®] PRISM 7.0 SOFTWARE; P-VALUE > 0.05..... 213

FIGURE 35 EFFECT OF IN VIVO ALCOHOL ON GROWTH HORMONE CANONICAL PATHWAY. PROTEOMIC ANALYSIS OF ALCOHOL VILLI (N=5) IN COMPARISON TO CONTROL VILLI (N=5) WERE MADE BY 3P5 PROTEOM'IC PLATFORM AT COCHIN HOSPITAL. ANALYSIS OF RELATIVE EXPRESSION/ FOLD CHANGE/ Z-SCORE AND STATISTICAL ANALYSIS WERE MADE BY PERSEUS[®] MAXQUANT[®], EXCEL[®] AND INGENUITY[®] SOFTWARE. (A): SCHEMATIC REPRESENTATION OF EFFECT OF IN VIVO ALCOHOL ON GROWTH HORMONE'S INGENUITY CANONICAL PATHWAYS. ALL LEGENDS ARE DESCRIBED ON LINK: [HTTPS://QIAGEN.SECURE.FORCE.COM/KNOWLEDGEBASE/ARTICLES/BASIC_TECHNICAL_Q_A/LEGEND](https://qiagen.secure.force.com/knowledgebase/articles/basic_technical_q_a/legend). (B) GRAPHICAL REPRESENTATION OF IN VIVO ALCOHOL EFFECT ON 4 PROTEINS IMPLICATED IN GROWTH HORMONE SIGNALING PATHWAY. RELATIVE PROTEIN EXPRESSIONS OF PDPK1 (3-PHOSPHOINOSITIDE-DEPENDENT PROTEIN KINASE 1), STAT5A (SIGNAL TRANSDUCER AND ACTIVATOR OF TRANSCRIPTION 5A), RPS6KA5 (RIBOSOMAL PROTEIN S6 KINASE ALPHA-5), IGFALS (INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-BINDING PROTEIN COMPLEX ACID LABILE SUBUNIT) ARE EXPRESSED IN FOLD CHANGE NORMALIZED ON CONTROL. STATISTICAL ANALYSES ARE MADE BY STUDENT TEST- P-VALUE > 0.05; P-VALUE ≤ 0.05 (*); P-VALUE ≤ 0.01 (**). 217

FIGURE 36- EFFECT OF IN VIVO ALCOHOL ON METABOLISM OF GLUCOSE. ANALYSIS ON PROTEOME OF ALCOHOL VILLI (N=5) IN COMPARISON TO CONTROL VILLI (N=5) WERE MADE BY 3P5 PROTEOM'IC PLATFORM AT COCHIN HOSPITAL. ANALYSIS OF RELATIVE EXPRESSION/ FOLD CHANGE/ Z-SCORE AND STATISTICAL ANALYSIS WERE MADE BY PERSEUS[®] MAXQUANT[®], EXCEL[®] AND INGENUITY[®] SOFTWARE. (A): SCHEMATIC REPRESENTATION OF EFFECT OF IN VIVO ALCOHOL ON METABOLISM OF GLUCOSE INGENUITY DISPLAY NETWORK. ALL LEGENDS ARE DESCRIBED ON LINK: [HTTPS://QIAGEN.SECURE.FORCE.COM/KNOWLEDGEBASE/ARTICLES/BASIC_TECHNICAL_Q_A/LEGEND](https://qiagen.secure.force.com/knowledgebase/articles/basic_technical_q_a/legend). (B) TABLE OF IN VIVO ALCOHOL EFFECT ON 47 PROTEINS IMPLICATED IN METABOLISM OF GLUCOSE. RELATIVE PROTEIN EXPRESSIONS OF ABCD3, ACAA1, AEBP1, ALDOB, APOA1, APOA4, CAPG, CASP4, CD44, CDH11, CDK2, CLEC14A, COL4A1, COL4A2, CTSB, EIF4BP2, ENPEP, GC, GPD2, GRB2, GSK3A, HBD, HLA-DRA, HSD11B1, HTT, ITGA2B, LAMTOR5, LCP1, LGALS3, LPIN2, LSM2, MARK2, NDUFA4, NEBL, PARP14, PDPK1, PEPD, REL, RPL28, SERPINC1, SERPINF1, SHBG, SLC30A7, TAP1, TF, THBS1, THOP1 ARE EXPRESSED IN FOLD CHANGE NORMALIZED ON CONTROL. STATISTICAL ANALYSES ARE MADE BY STUDENT TEST- P-VALUE > 0.05; P-VALUE ≤ 0.05 (*); P-VALUE ≤ 0.01 (**); P-VALUE ≤ 0.001 (***); P-VALUE ≤ 0.0001 (****) 231

FIGURE 37- EFFECT OF IN VIVO ALCOHOL ON LXR/RXR ACTIVATION CANONICAL PATHWAY. ANALYSIS ON PROTEOME OF ALCOHOL VILLI (N=5) IN COMPARISON TO CONTROL VILLI (N=5) WERE MADE BY 3P5 PROTEOM'IC PLATFORM AT COCHIN HOSPITAL. ANALYSIS OF RELATIVE EXPRESSION/ FOLD CHANGE/ Z-SCORE AND STATISTICAL ANALYSIS WERE MADE BY PERSEUS[®] MAXQUANT[®], EXCEL[®] AND INGENUITY[®] SOFTWARES. (A): SCHEMATIC REPRESENTATION OF EFFECT OF IN VIVO ALCOHOL ON LXR/RXR INGENUITY CANONICAL PATHWAYS. ALL LEGENDS ARE DESCRIBED ON LINK: [HTTPS://QIAGEN.SECURE.FORCE.COM/KNOWLEDGEBASE/ARTICLES/BASIC_TECHNICAL_Q_A/LEGEND](https://qiagen.secure.force.com/knowledgebase/articles/basic_technical_q_a/legend). (B) GRAPHICAL REPRESENTATION OF IN VIVO ALCOHOL EFFECT ON 10 PROTEINS IMPLICATED LXR/RXR SIGNALING PATHWAY. RELATIVE PROTEIN EXPRESSIONS OF GC (VITAMIN D-BINDING PROTEIN), APOA4 (APOLIPOPROTEIN A-IV), TF (SEROTRANSFERRIN), SERPINF1 (SERPIN FAMILY F MEMBER 1/ PIGMENT EPITHELIUM-DERIVED FACTOR), APOA1 (APOLIPOPROTEIN A-I), RBP4

(RETINOL-BINDING PROTEIN 4), APOC1 (APOLIPOPROTEIN C-I), A1BG (ALPHA-1B-GLYCOPROTEIN), REL (PROTO-ONCOGENE C-REL), FDFT1 (SQUALENE SYNTHASE) ARE EXPRESSED IN FOLD CHANGE NORMALIZED ON CONTROL. STATISTICAL ANALYSES ARE MADE BY STUDENT TEST- P-VALUE > 0.05; P-VALUE ≤ 0.05 (*); P-VALUE ≤ 0.01 (**); AND FISHER TEST (-1.5 < FC < 1.5)..... 232

FIGURE 38 EFFECT OF IN VIVO ALCOHOL ON PPARA/RXRα ACTIVATION CANONICAL PATHWAY. ANALYSIS ON PROTEOME OF ALCOHOL VILLI (N=5) IN COMPARISON TO CONTROL VILLI (N=5) WERE MADE BY 3P5 PROTEOM'IC PLATFORM AT COCHIN HOSPITAL. ANALYSIS OF RELATIVE EXPRESSION/ FOLD CHANGE/ Z-SCORE AND STATISTICAL ANALYSIS WERE MADE BY PERSEUS® MAXQUANT®, EXCEL® AND INGENUITY® SOFTWARES. (A): SCHEMATIC REPRESENTATION OF EFFECT OF IN VIVO ALCOHOL ON PPARA/RXRα INGENUITY CANONICAL PATHWAYS. ALL LEGENDS ARE DESCRIBED ON LINK: [HTTPS://QIAGEN.SECURE.FORCE.COM/KNOWLEDGEBASE/ARTICLES/BASIC TECHNICAL Q A/LEGEND](https://qiagen.secure.force.com/knowledgebase/articles/basic_technical_q_a/legend). (B) GRAPHICAL REPRESENTATION OF IN VIVO ALCOHOL EFFECT ON 5 PROTEINS IMPLICATED PPARA/RXRα SIGNALING PATHWAY. RELATIVE PROTEIN EXPRESSIONS OF ACAA1 (3-KETOACYL-CoA THIOLEASE, PEROXISOMAL), APOA1 (APOLIPOPROTEIN A-I), GPD2 (GLYCEROL-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE, MITOCHONDRIAL), GRB2 (GROWTH FACTOR RECEPTOR-BOUND PROTEIN 2), REL (PROTO-ONCOGENE C-REL) ARE EXPRESSED IN FOLD CHANGE NORMALIZED ON CONTROL. STATISTICAL ANALYSES ARE MADE BY STUDENT TEST- P-VALUE > 0.05; P-VALUE ≤ 0.05 (*); AND FISHER TEST (-1.5 < FC < 1.5) 233

FIGURE 39- EFFECT OF IN VIVO ALCOHOL ON ERK/MAPK CANONICAL PATHWAY. ANALYSIS ON PROTEOME OF ALCOHOL VILLI (N=5) IN COMPARISON TO CONTROL VILLI (N=5) WERE MADE BY 3P5 PROTEOM'IC PLATFORM AT COCHIN HOSPITAL. ANALYSIS OF RELATIVE EXPRESSION/ FOLD CHANGE/ Z-SCORE AND STATISTICAL ANALYSIS WERE MADE BY PERSEUS® MAXQUANT®, EXCEL® AND INGENUITY® SOFTWARES. (A): SCHEMATIC REPRESENTATION OF EFFECT OF IN VIVO ALCOHOL ON GROWTH HORMONE'S INGENUITY CANONICAL PATHWAYS. ALL LEGENDS ARE DESCRIBED ON LINK: [HTTPS://QIAGEN.SECURE.FORCE.COM/KNOWLEDGEBASE/ARTICLES/BASIC TECHNICAL Q A/LEGEND](https://qiagen.secure.force.com/knowledgebase/articles/basic_technical_q_a/legend). (B) GRAPHICAL REPRESENTATION OF IN VIVO ALCOHOL EFFECT ON 8 PROTEINS IMPLICATED ERK/MAPK SIGNALING PATHWAY. RELATIVE PROTEIN EXPRESSIONS OF GRB2(GROWTH FACTOR RECEPTOR-BOUND PROTEIN 2), BCAR1 (BREAST CANCER ANTI-ESTROGEN RESISTANCE PROTEIN 1), ITGA2 (INTEGRIN ALPHA-2), ITGA3 (INTEGRIN ALPHA-3), ITGA2B (INTEGRIN ALPHA-IIb), ITGAM (INTEGRIN ALPHA-M), PPP2R5E (SERINE/THREONINE-PROTEIN PHOSPHATASE 2A 56 kDa REGULATORY SUBUNIT EPSILON ISOFORM), RPS6KA5 (RIBOSOMAL PROTEIN S6 KINASE ALPHA-5), ARE EXPRESSED IN FOLD CHANGE NORMALIZED ON CONTROL. STATISTICAL ANALYSES ARE MADE BY STUDENT TEST- P-VALUE > 0.05; P-VALUE ≤ 0.05 (*); P-VALUE ≤ 0.01 AND FISHER TEST (-1.5 < FC < 1.5) 235

FIGURE 40- EFFECT OF IN VIVO ALCOHOL ON PI3K/AKT CANONICAL PATHWAY. ANALYSIS ON PROTEOME OF ALCOHOL VILLI (N=5) IN COMPARISON TO CONTROL VILLI (N=5) WERE MADE BY 3P5 PROTEOM'IC PLATFORM AT COCHIN HOSPITAL. ANALYSIS OF RELATIVE EXPRESSION/ FOLD CHANGE/ Z-SCORE AND STATISTICAL ANALYSIS WERE MADE BY PERSEUS® MAXQUANT®, EXCEL® AND INGENUITY® SOFTWARE. (A): SCHEMATIC REPRESENTATION OF EFFECT OF IN VIVO ALCOHOL ON GROWTH HORMONE'S INGENUITY CANONICAL PATHWAYS. ALL LEGENDS ARE DESCRIBED ON LINK: [HTTPS://QIAGEN.SECURE.FORCE.COM/KNOWLEDGEBASE/ARTICLES/BASIC TECHNICAL Q A/LEGEND](https://qiagen.secure.force.com/knowledgebase/articles/basic_technical_q_a/legend). (B) GRAPHICAL REPRESENTATION OF IN VIVO ALCOHOL EFFECT ON 10 PROTEINS IMPLICATED PI3K/AKT SIGNALING PATHWAY. RELATIVE PROTEIN EXPRESSIONS OF GSK3A (GLYCOGEN SYNTHASE KINASE-3 ALPHA), PDK1 (3-PHOSPHOINOSITIDE-DEPENDENT PROTEIN KINASE 1), GRB2(GROWTH FACTOR RECEPTOR-BOUND PROTEIN 2), REL (PROTO-ONCOGENE C-REL), ITGA2 (INTEGRIN ALPHA-2) ,ITGA3 (INTEGRIN ALPHA-3), ITGA2B (INTEGRIN ALPHA-IIb), ITGAM (INTEGRIN ALPHA-M), IL6ST

(INTERLEUKIN-6 RECEPTOR SUBUNIT BETA), PPP2R5E (SERINE/THREONINE-PROTEIN PHOSPHATASE 2A 56 KDA REGULATORY SUBUNIT EPSILON ISOFORM), ARE EXPRESSED IN FOLD CHANGE NORMALIZED ON CONTROL. STATISTICAL ANALYSES ARE MADE BY STUDENT TEST- P-VALUE> 0.05; P-VALUE ≤ 0.05 (*); P-VALUE ≤ 0.01 (**);..... 236

FIGURE 41- IMPACT OF IN VIVO ALCOHOL ON mTOR SIGNALING PATHWAY. ANALYSIS OF mRNA EXPRESSION OF ALCOHOL VILLI (N=5) IN COMPARISON TO CONTROL VILLI (N=5) WERE MADE BY QPCR ANALYSIS. AND STATISTICAL ANALYSIS WERE MADE BY EXCEL SOFTWARE AND GRAPHPAD PRISM 7.0. GRAPHICAL REPRESENTATION OF IN VIVO ALCOHOL EFFECT ON mRNA EXPRESSION OF IL6 (INTERLEUKIN-6), PTEN (PHOSPHATIDYLINOSITOL 3,4,5-TRISPHOSPHATE 3-PHOSPHATASE AND DUAL-SPECIFICITY PROTEIN PHOSPHATASE), RICTOR (RAPAMYCIN-INSENSITIVE COMPANION OF mTOR), TSC1 (HAMARTIN), TSC2 (TUBERIN), mTOR (MAMMALIAN TARGET OF RAPAMYCIN) ARE EXPRESSED IN FOLD CHANGE NORMALIZED ON CONTROL. STATISTICAL ANALYSES ARE MADE BY T-TEST WITH CONSISTENT SD, P-VALUE> 0.05; P-VALUE ≤ 0.05 (*); P-VALUE ≤ 0.01 (**); THE SIGNALING PATHWAY PICTURE IS MODIFIED FROM LAETITIA COUTTE ET AL. 2012. 237

FIGURE 42- EFFECT OF IN VIVO ALCOHOL ON mTOR CANONICAL PATHWAY. ANALYSIS ON PROTEOME OF ALCOHOL VILLI (N=5) IN COMPARISON TO CONTROL VILLI (N=5) WERE MADE BY 3P5 PROTEOM^{IC} PLATFORM AT COCHIN HOSPITAL. ANALYSIS OF RELATIVE EXPRESSION/ FOLD CHANGE/ Z-SCORE AND STATISTICAL ANALYSIS WERE MADE BY MAXQUANT[®], EXCEL[®] AND INGENUITY[®] SOFTWARES. (A): SCHEMATIC REPRESENTATION OF EFFECT OF IN VIVO ALCOHOL ON mTOR'S SIGNALING INGENUITY CANONICAL PATHWAYS. ALL LEGENDS ARE DESCRIBED ON LINK:

[HTTPS://QIAGEN.SECURE.FORCE.COM/KNOWLEDGEBASE/ARTICLES/BASIC TECHNICAL Q A/LEGEND](https://qiagen.secure.force.com/knowledgebase/articles/basic_technical_q_a/legend). (B) GRAPHICAL REPRESENTATION OF IN VIVO ALCOHOL EFFECT ON 8 PROTEINS IMPLICATED ERK/MAPK SIGNALING PATHWAY. RELATIVE PROTEIN EXPRESSIONS OF RPS6KA5 (RIBOSOMAL PROTEIN S6 KINASE ALPHA-5), PDPK1 (3-PHOSPHOINOSITIDE-DEPENDENT PROTEIN KINASE 1), PLD3 (5'-3' EXONUCLEASE PLD3), RPS16 (40S RIBOSOMAL PROTEIN S16), MLST8 (TARGET OF RAPAMYCIN COMPLEX SUBUNIT LST8), DGKZ (DIACYLGLYCEROL KINASE ZETA), EIF4EBP2 (EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 4E-BINDING PROTEIN 2) AND PPP2R5E (SERINE/THREONINE-PROTEIN PHOSPHATASE 2A 56 KDA REGULATORY SUBUNIT EPSILON ISOFORM), ARE EXPRESSED IN FOLD CHANGE NORMALIZED ON CONTROL. STATISTICAL ANALYSES ARE MADE BY STUDENT TEST- P-VALUE> 0.05; P-VALUE ≤ 0.05 (*); P-VALUE ≤ 0.01 (**); P-VALUE ≤ 0.001 (***) ; 239

FIGURE 43 IMPACT OF ALCOHOL ON NEUROTRANSMITTER AND THEIR RECEPTORS. GRAPHICAL REPRESENTATION OF IN VIVO EFFECT OF ALCOHOL ON 13 RECEPTORS OF NEUROTRANSMITTERS. ALCOHOL EXPOSED VILLI WERE COMPARED WITH TERM CONTROL VILLI, BUT THE mRNA EXPRESSION OF EA VILLI ARE INDICATED TOO (N=5 PLACENTAS/CONDITION); THE DETAILS OF THIS RECEPTORS ARE INDICATED IN TABLE 15-16-17-18. THESE RESULTS WERE OBTAINED BY QPCR WITH QIAGEN RT2 PROFILER PLATES. THE STATISTICS WERE PERFORMED WITH GRAPHPAD PRISM 7.0. RELATIVE mRNA EXPRESSIONS ARE EXPRESSED IN FOLD CHANGE NORMALIZED ON CONTROL. STATISTICAL ANALYSES ARE MADE BY UNPAIRED T-TEST WITH CONSISTENT SD- P-VALUE> 0.05; P-VALUE ≤ 0.05 (*); P-VALUE ≤ 0.01 (**); P-VALUE ≤ 0.001 (***)..... 250

FIGURE 44- EFFECT OF IN VIVO ALCOHOL ON SECRETION OF PLGF (PLACENTA GROWTH FACTOR) IN VITRO ■ : CONTROL N=5; ■ : ALCOHOL N=5. GRAPHICAL REPRESENTATION OF SECRETION OF PLGF (NMOL/L)/10⁶CELLS BY VCT'S PRIMARY CULTURE FOR 24H-48H OR 72H OF INCUBATION WITH SVF MEDIUM, EXPOSED IN VITRO AT [0.5G/L] OR [2G/L] EtOH OR NOT. CULTURE MEDIUM OF EACH CONDITION WERE COLLECTED, AND PLGF WAS MEASURED BY AUTOMATE ON THE COCHIN HOSPITAL PLATFORM STATISTICAL TEST: ANOVA TWO WAY + SIDAK'S MULTIPLE COMPARISONS TEST WERE MADE WITH GRAPH PAD[®] PRISM 7.0 SOFTWARE; P-VALUE> 0.05. 258

FIGURE 45- STUDY OF EXPRESSION OF CD146 IN TROPHOBLAST TISSUE. VILLOUS EXPLANT OF N=4 PLACENTA "CONTROL" AND N=4 PLACENTA "ALCOHOL" HAVE BEEN INCUBATED IN SVF FOR 6 DAY AND THEN 3 TREATMENT WERE ASSESSED FOR 24H OR 48H WITH SVF MEDIUM (CONTROL), SVF MEDIUM + [0.5G/L] ETHANOL OR SVF MEDIUM+ [2G/L] ETHANOL. AT THE END OF TREATMENT, VILLI ARE FIXED WITH PFA (LIKE ITS DESCRIBED IN MATERIAL & METHODS), CUT IN 10µM SLICE AND INCUBATED WITH CD146 (RED), DAPI (BLUE) (NUCLEUS) AND CK7 (GREEN) (MEMBRANE AND STRUCTURE OF VILLI) ANTIBODY. AFTER FLUORESCENT SECONDARY ANTIBODY INCUBATION AND MOUNTING OF MICROSCOPY SLIDES, VILLI HAVE BEEN WATCHED ON LEICA CONFOCAL MICROSCOPY (x40 WITH OIL). HERE, THE PICTURE REPRESENTS VILLI EXPOSED OR NOT TO IN VIVO ALCOHOL AND SUR-EXPOSED TO ALCOHOL FOR 48H COMPARED TO SVF. ARROWS HAVE BEEN PLACED AT SOME INTERESTING LOCATIONS OF CD146 LABEL. 260

FIGURE 46- EFFECT OF IN VIVO ALCOHOL ON CD146 EXPRESSION AND EVOLUTIONARY CARTOGRAPHY. A) GRAPHICAL REPRESENTATION OF MRNA EXPRESSION OF IN VITRO ALCOHOL EFFECT ON CD146. PRIMARY VCT'S CELLS (FROM PLACENTA ■ : CONTROL N=6) ARE INCUBATED WITH SVF AND EXPOSED OR NOT AT [0.5G/L] OR [2G/L] ETOH FOR 24H-48H OR 72H. STATISTICAL ANALYSES ARE MADE BY ONE WAY ANOVA- P-VALUE > 0.05; P-VALUE ≤ 0.05 (*); P-VALUE ≤ 0.01 (**); P-VALUE ≤ 0.001 (***) ; P-VALUE ≤ 0.0001 (****). B) GRAPHICAL REPRESENTATION OF PROTEIN EXPRESSION OF CD146. PROTEOMIC ANALYSIS OF ALCOHOL VILLI (N=5), LATE ABORTION VILLI (N=5) AND EARLY ABORTION (N=5) IN COMPARISON TO CONTROL VILLI (N=5) WERE MADE BY 3P5 PROTEOM'IC PLATFORM AT COCHIN HOSPITAL. ANALYSIS OF RELATIVE EXPRESSION/ FOLD CHANGE AND STATISTICAL ANALYSIS WERE MADE BY MAXQUANT®, EXCEL® AND INGENUITY® AND GRAPHPAD PRISM SOFTWARE. RELATIVE PROTEIN EXPRESSION OF CD146 IS EXPRESSED IN FOLD CHANGE NORMALIZED ON CONTROL. STATISTICAL ANALYSES ARE MADE BY STUDENT TEST- P-VALUE > 0.05; P-VALUE ≤ 0.05 (*); P-VALUE ≤ 0.01 (**); P-VALUE ≤ 0.001 (***) ; P-VALUE ≤ 0.0001 (****); ■ : CONTROL N=5; ■ : ALCOHOL N=5; ■ : LATER ABORTION N=5; ■ : EARLY ABORTION N=5 261

FIGURE 47- SYNTHESIS OF PLACENTAL ANGIOGENESIS PATHWAY IN PHYSIOLOGICAL WAY. CD44 IS CAPABLE TO COMPLEX WITH ADAM10 AND BIND TO VEGF RECEPTOR. THIS ACTION ENHANCES THE ACTIVATION PI3K/ AKT AND MTOR PATHWAY. SOME REGULATORS ARE IMPLICATED IN THIS WAY LIKE RTK RECEPTOR (WHICH CAN BE ACTIVATED BY IL6 AND CD44 TOO) WHICH IS AN ACTIVATOR OF PI3K/AKT PATHWAY; OR PTEN WHICH IS AN INHIBITOR OF PI3K/AKT PATHWAY. ANOTHER WAY REPRESENTED ON LEFT SIDE IS THE HCG/LH PATHWAY; HCG CAN BIND ON HIS RECEPTOR AND ACTIVATE TWO WAYS: FIRST IS THE ACTIVATION OF COMPLEX PLC/GQ-PROTEIN (AN ACTIVATOR OF PI3K/AKT); THE SECOND WAY IS THE ACTIVATION BY GS PROTEIN OF THE AMPc/PKA PATHWAY, WHICH IS A POSITIVE REGULATOR OF GCM1 (NECESSARY TO ST FUSION). GCM1 IS TRANSLOCATED IN THE NUCLEUS AND BIND TO GBS 1 (WHICH HARBORS AN AP2-BINDING SITE). THIS ACTION ACTIVATES THE EXPRESSION OF HCGβ WHICH IS RELEASED OUT AND HAVE POSITIVE FEEDBACK ON HCG PRODUCTION. 262

FIGURE 48- EFFECT OF IN VIVO ALCOHOL ON ADAM10 EXPRESSION AND EVOLUTIONARY CARTOGRAPHY. A) GRAPHICAL REPRESENTATION OF MRNA EXPRESSION OF ADAM10 IN VILLI. 4 TYPES OF VILLI ARE ANALYSED: C= TERM CONTROL; AL= IN VIVO ALCOHOL TERM; LA= LATE ABORTION (WITHOUT ALCOHOL); EA = EARLY ABORTION (WITHOUT ALCOHOL). RELATIVE MRNA EXPRESSIONS ARE OBTAINED BY QPCR ANALYSIS (QIAGEN RT2 PROFILER CUSTOM PLATE) AND ARE EXPRESSED IN FOLD CHANGE NORMALIZED ON CONTROL. STATISTICAL ANALYSES ARE MADE WITH GRAPHPAD PRISM, BY T-TEST WITH CONSISTENT SD- P-VALUE > 0.05; P-VALUE ≤ 0.05 (*); P-VALUE ≤ 0.01 (**); P-VALUE ≤ 0.001 (***) ; P-VALUE ≤ 0.0001 (****). B) GRAPHICAL REPRESENTATION OF PROTEIN EXPRESSION OF ADAM10. PROTEOMIC ANALYSIS OF ALCOHOL VILLI (N=5), LATE ABORTION VILLI (N=5) AND EARLY ABORTION (N=5) IN COMPARISON TO CONTROL VILLI (N=5) WERE MADE BY 3P5

PROTEOM'IC PLATFORM AT COCHIN HOSPITAL. ANALYSIS OF RELATIVE EXPRESSION/ FOLD CHANGE AND STATISTICAL ANALYSIS WERE MADE BY MAXQUANT®, EXCEL® AND INGENUITY® AND GRAPHPAD PRISM SOFTWARE. RELATIVE PROTEIN EXPRESSION OF ADAM10 IS EXPRESSED IN FOLD CHANGE NORMALIZED ON CONTROL. STATISTICAL ANALYSES ARE MADE BY STUDENT TEST- P-VALUE > 0.05; P-VALUE ≤ 0.05 (*); P-VALUE ≤ 0.01 (**); P-VALUE ≤ 0.001 (***) ; ■■■ : CONTROL N=5; ■■■ : ALCOHOL N=5; ■■■ : LATER ABORTION N=5; ■■■ : EARLY ABORTION N=5 263

FIGURE 49- EFFECT OF IN VIVOALCOHOL ON CD44 EXPRESSION AND EVOLUTIONARY CARTOGRAPHY. GRAPHICAL REPRESENTATION OF PROTEIN EXPRESSION OF CD44. PROTEOMIC ANALYSIS OF ALCOHOL VILLI (N=5), LATE ABORTION VILLI (N=5) AND EARLY ABORTION (N=5) IN COMPARISON TO CONTROL VILLI (N=5) WERE MADE BY 3P5 PROTEOM'IC PLATFORM AT COCHIN HOSPITAL. ANALYSIS OF RELATIVE EXPRESSION/ FOLD CHANGE AND STATISTICAL ANALYSIS WERE MADE BY MAXQUANT®, EXCEL® AND INGENUITY® AND GRAPHPAD PRISM SOFTWARE. RELATIVE PROTEIN EXPRESSION OF CD44 IS EXPRESSED IN FOLD CHANGE NORMALIZED ON CONTROL. STATISTICAL ANALYSES ARE MADE BY STUDENT TEST- P-VALUE > 0.05; P-VALUE ≤ 0.05 (*); P-VALUE ≤ 0.01 (**); ■■■ : CONTROL N=5; ■■■ : ALCOHOL N=5; ■■■ : LATER ABORTION N=5; ■■■ : EARLY ABORTION N=5 264

FIGURE 50- EFFECT OF IN VIVOALCOHOL ON PTEN EXPRESSION AND EVOLUTIONARY CARTOGRAPHY. A) A) GRAPHICAL REPRESENTATION OF MRNA EXPRESSION OF PTEN IN VILLI. 4 TYPES OF VILLI ARE ANALYSED: C= TERM CONTROL; AL= IN VIVO ALCOHOLTERM; LA= LATE ABORTION (WITHOUT ALCOHOL); EA = EARLY ABORTION (WITHOUT ALCOHOL). RELATIVE MRNA EXPRESSIONS ARE OBTAINED BY QPCR ANALYSIS (QIAGEN RT2 PROFILER CUSTOM PLATE) AND ARE EXPRESSED IN FOLD CHANGE NORMALIZED ON CONTROL. STATISTICAL ANALYSES ARE MADE WITH GRAPHPAD PRISM, BY T-TEST WITH CONSISTENT SD- P-VALUE > 0.05; P-VALUE ≤ 0.05 (*); P-VALUE ≤ 0.01 (**); P-VALUE ≤ 0.001 (***) ; P-VALUE ≤ 0.0001 (****). B) GRAPHICAL REPRESENTATION OF MRNA EXPRESSION OF PTEN IN CELLS FROM VCT PRIMARY CULTURE. CELLS FROM CONTROL PLACENTA (■■■ : CONTROL N=6 AND ■■■ : ALCOHOL N=6) ARE INCUBATED WITH SVF WITH OR WITHOUT [0.5G/L] OR [2G/L] ETOH FOR 24H-48H OR 72H. RELATIVE MRNA EXPRESSIONS ARE OBTAINED BY QPCR ANALYSIS (QIAGEN RT2 PROFILER CUSTOM PLATE) AND ARE EXPRESSED IN FOLD CHANGE NORMALIZED ON CONTROL. STATISTICAL ANALYSES ARE MADE WITH GRAPHPAD PRISM, BY MULTIPLE T-TEST WITH CONSISTENT SD- P-VALUE > 0.05; P-VALUE ≤ 0.05 (*); P-VALUE ≤ 0.01 (**); P-VALUE ≤ 0.001 (***) ; P-VALUE ≤ 0.0001 (****). C) GRAPHICAL REPRESENTATION OF PROTEIN EXPRESSION OF GCM1. PROTEOMIC ANALYSIS OF ALCOHOL VILLI (N=5), LATE ABORTION VILLI (N=5) AND EARLY ABORTION (N=5) IN COMPARISON TO CONTROL VILLI (N=5) WERE MADE BY 3P5 PROTEOM'IC PLATFORM AT COCHIN HOSPITAL. ANALYSIS OF RELATIVE EXPRESSION/ FOLD CHANGE AND STATISTICAL ANALYSIS WERE MADE BY MAXQUANT®, EXCEL® AND INGENUITY® AND GRAPHPAD PRISM SOFTWARE. RELATIVE PROTEIN EXPRESSION OF GCM1 IS EXPRESSED IN FOLD CHANGE NORMALIZED ON CONTROL. STATISTICAL ANALYSES ARE MADE BY STUDENT TEST- P-VALUE > 0.05; P-VALUE ≤ 0.05 (*); P-VALUE ≤ 0.01 (**); P-VALUE ≤ 0.001 (***) ; P-VALUE ≤ 0.0001 (****); ■■■ : CONTROL N=5; ■■■ : ALCOHOL N=5; ■■■ : LATER ABORTION N=5; ■■■ : EARLY ABORTION N=5 266

FIGURE 51- EFFECT OF IN VIVOALCOHOL ON GCM1 EXPRESSION AND EVOLUTIONARY CARTOGRAPHY. A) GRAPHICAL REPRESENTATION OF MRNA EXPRESSION OF GCM1 IN CONTROL CELLS. CELLS FROM CONTROL PLACENTA (■■■ : CONTROL N=6) ARE INCUBATED WITH SVF WITH OR WITHOUT [0.5G/L] OR [2G/L] ETOH FOR 24H-48H OR 72H. RELATIVE MRNA EXPRESSIONS ARE OBTAINED BY QPCR ANALYSIS (QIAGEN RT2 PROFILER CUSTOM PLATE) AND ARE EXPRESSED IN FOLD CHANGE NORMALIZED ON CONTROL. STATISTICAL ANALYSES ARE MADE WITH GRAPHPAD PRISM, BY MULTIPLE T-TEST WITH CONSISTENT SD- P-VALUE > 0.05; P-VALUE ≤ 0.05 (*); P-VALUE ≤ 0.01 (**); P-VALUE ≤ 0.001 (***) ; P-VALUE ≤ 0.0001 (****). B) GRAPHICAL

REPRESENTATION OF PROTEIN EXPRESSION OF GCM1. PROTEOMIC ANALYSIS OF ALCOHOL VILLI (N=5), LATE ABORTION VILLI (N=5) AND EARLY ABORTION (N=5) IN COMPARISON TO CONTROL VILLI (N=5) WERE MADE BY 3P5 PROTEOM'IC PLATFORM AT COCHIN HOSPITAL. ANALYSIS OF RELATIVE EXPRESSION/ FOLD CHANGE AND STATISTICAL ANALYSIS WERE MADE BY MAXQUANT®, EXCEL® AND INGENUITY® AND GRAPHPAD PRISM SOFTWARE. RELATIVE PROTEIN EXPRESSION OF GCM1 IS EXPRESSED IN FOLD CHANGE NORMALIZED ON CONTROL. STATISTICAL ANALYSES ARE MADE BY STUDENT TEST- P-VALUE> 0.05; P-VALUE ≤ 0.05 (*); P-VALUE ≤ 0.01 (**); ■■■ : CONTROL N=5; ■■■■ : ALCOHOL N=5; ■■■■■ : LATER ABORTION N=5; ■■■■■■ : EARLY ABORTION N=5 267

FIGURE 52- EFFECT OF IN VIVOALCOHOL ON METABOLISM OF REACTIVE OXYGEN SPECIES. ANALYSIS ON PROTEOME OF ALCOHOL VILLI (N=5) IN COMPARISON TO CONTROL VILLI (N=5) WERE MADE BY 3P5 PROTEOM'IC PLATFORM AT COCHIN HOSPITAL. ANALYSIS OF RELATIVE EXPRESSION/ FOLD CHANGE/ Z-SCORE AND STATISTICAL ANALYSIS WERE MADE BY MAXQUANT®, EXCEL® AND INGENUITY® SOFTWARE. SCHEMATIC REPRESENTATION OF EFFECT OF IN VIVOALCOHOL ON METABOLISM OF REACTIVE OXYGEN SPECIES INGENUITY DISPLAY NETWORK. ALL LEGENDS ARE DESCRIBED ON LINK:

[HTTPS://QIAGEN.SECURE.FORCE.COM/KNOWLEDGEBASE/ARTICLES/BASIC_TECHNICAL_Q_A/LEGEND](https://qiagen.secure.force.com/KnowledgeBase/articles/basic_technical_q_a/legend). GRAPHICAL

REPRESENTATION OF IN VIVOALCOHOL EFFECT ON 24 PROTEINS IMPLICATED IN METABOLISM OF ROS. RELATIVE PROTEIN EXPRESSIONS OF APOA4, BAK1, CD44, CRYAB, DCN, FAS, FBP1, FTH1, HCK, HTT, IRF6,ITGAM, LGALS3, NOL3, PGAM5, PON2, RAB27A, RBP4, SERPINF1, SLC9A3R1, STAT5, TF, ALOX5, APOA1 ARE EXPRESSED IN FOLD CHANGE NORMALIZED ON CONTROL. STATISTICAL ANALYSES ARE MADE BY STUDENT TEST- P-VALUE> 0.05; P-VALUE ≤ 0.05 (*); P-VALUE ≤ 0.01 (**);..... 270

FIGURE 53- IMPACT OF IN VITRO ALCOHOL ON PLACENTAL SECRETIONS IN PERFUSION MODEL. HEATMAP T-TEST WITH FDR (BENJAMINI HOCHBERG) (STATISTICAL TEST MADE BY MAXQUANT AND PERSEUS SOFTWARE (Z-SCORE PROTEIN (T-TEST) AND SIGNIFICANT FDR (BENJAMIN HOCHBERG))). PLACENTA FROM CONTROL PATIENT WERE PERFUSED DURING 2H WITH:..... 271

FIGURE 54 IMPACT OF ALCOHOL ON PLACENTAL ANGIOGENESIS PATHWAY. REGARDING ALL OUR RESULT, WE INDICATED ALL THE SIGNIFICANT ALTERATIONS OF ACTOR FROM ANGIOGENESIS PATHWAY BY IN VIVO ALCOHOL. 300

Liste des tableaux

TABLEAU 1 ESTIMATION DU NOMBRE DE CONSOMMATEURS DE SUBSTANCES PSYCHOACTIVES EN FRANCE METROPOLITAINE D'APRES LE TABLEAU DU HAUT CONSEIL DE LA SANTE PUBLIQUE, ADSP N°95 (2016)	119
TABLEAU 2 APERÇU, NON EXHAUSTIF, DE L'ENSEMBLE DES TROUBLES CAUSES PAR L'ALCOOLISME FŒTAL AU COURS DE LA VIE DE L'INDIVIDU TCAF ; TABLEAU MODIFIE D'APRES LE RAPPORT DE L'ACADEMIE NATIONAL DE MEDECINE REDIGE PAR CREPIN G. ET BREART G. (2016)	134
TABLEAU 3 COMPLICATIONS NEONATALES ET PERINATALES RELATIVES A LA PREECLAMPSIE, MODIFIE D'APRES POON L.C. ET AL. 2019	151
TABLEAU 4 – CARACTERISTIQUES CLINIQUES DES PATIENTES (ET LEUR BEBE) INCLUSES DANS LA COLLECTE DE TISSUS PLACENTAIRES ISSUS DE FEMMES AYANT ETE EXPOSEES A L'ALCOOL IN VIVO.	168
TABLEAU 5 COMPOSITION DES SOLUTIONS UTILISEES POUR LA PERFUSION EX VIVO DES PLACENTAS.....	174
TABLE 6 EFFECT OF IN VIVO ALCOHOL ON ENDOCRINE SYSTEM DISORDER. ANALYSIS ON PROTEOME OF ALCOHOL VILLI (N=5) IN COMPARISON TO CONTROL VILLI (N=5) WERE MADE BY 3P5 PROTEOM'IC PLATFORM AT COCHIN HOSPITAL. ANALYSIS OF RELATIVE EXPRESSION/ FOLD CHANGE/ Z-SCORE AND STATISTICAL ANALYSIS WERE MADE BY MAXQUANT®, EXCEL® AND INGENUITY® SOFTWARE. ANALYSE OF THE IMPACT OF ALCOHOL ON ENDOCRINE SYSTEM DISORDERS. 21 ENDOCRINE FUNCTIONS ARE AFFECTED SIGNIFICATIVELY BY IN VIVO ALCOHOL (P-VALUE<0.05. FISHER TEST); 5 ENDOCRINE FUNCTIONS ARE ACTIVATED BY ALCOHOL (-1.5> Z-SCORE <1.5; NS (STUDENT TEST)). IN TOTAL, 225 PROTEINS ARE ALTERED BY IN VIVO ALCOHOL.....	218
TABLE 7- IMPACT OF IN VIVO ALCOHOL ON SLC TRANSPORTER PROTEIN. PROTEOMIC ANALYSIS OF "ALCOHOL" VILLI (N=5) IN COMPARISON TO "CONTROL" VILLI (N=5) WERE MADE BY 3P5 PROTEOM'IC PLATFORM AT COCHIN HOSPITAL. ANALYSIS OF RELATIVE EXPRESSION/ FOLD CHANGE/ Z-SCORE AND STATISTICAL ANALYSIS WERE MADE BY MAXQUANT®, PERSEUS™ AND EXCEL® SOFTWARE. STATISTICAL ANALYSES ARE MADE BY STUDENT TEST (-1.5 ≤ FOLD CHANGE ≥ 1.5) AND FISHER TEST (P-VALUE > 0.05; P-VALUE ≤ 0.05 (*); P-VALUE ≤ 0.01 (**); P-VALUE ≤ 0.001 (***)). P-VALUE ≤ 0.0001 (****). IT'S INDICATED IF THE SLC ARE UPREGULATED OR DOWNREGULATED WITH SIGNIFICANT P-VALUE; IF THE P-VALUE IS NO SIGNIFICANT BUT FOLD CHANGE ARE SIGNIFICANT THE UP OR DOWN REGULATIONS ARE NOTED IN BLACK.	222
TABLE 8 IMPACT OF IN VIVO ALCOHOL ON SLC TRANSPORTER PROTEIN. PROTEOMIC ANALYSIS OF "ALCOHOL" VILLI (N=5) IN COMPARISON TO "CONTROL" VILLI (N=5) WERE MADE BY 3P5 PROTEOM'IC PLATFORM AT COCHIN HOSPITAL. ANALYSIS OF RELATIVE EXPRESSION/ FOLD CHANGE/ Z-SCORE AND STATISTICAL ANALYSIS WERE MADE BY MAXQUANT®, PERSEUS™ AND EXCEL® SOFTWARE. STATISTICAL ANALYSES ARE MADE BY STUDENT TEST (-1.5 ≤ FOLD CHANGE ≥ 1.5) AND FISHER TEST (P-VALUE > 0.05; P-VALUE ≤ 0.05 (*); P-VALUE ≤ 0.01 (**); P-VALUE ≤ 0.001 (***)). P-VALUE ≤ 0.0001 (****). IT'S INDICATED IF THE SLC ARE UPREGULATED OR DOWNREGULATED WITH SIGNIFICANT P-VALUE; IF THE P-VALUE IS NO SIGNIFICANT BUT FOLD CHANGE ARE SIGNIFICANT THE UP OR DOWN REGULATIONS ARE NOTED IN BLACK.	223
TABLE 9- IMPACT OF IN VIVO ALCOHOL ON TRANSPORTER PROTEIN. PROTEOMIC ANALYSIS OF "ALCOHOL" VILLI (N=5) IN COMPARISON TO "CONTROL" VILLI (N=5) WERE MADE BY 3P5 PROTEOM'IC PLATFORM AT COCHIN HOSPITAL. ANALYSIS OF RELATIVE EXPRESSION/ FOLD CHANGE/ Z-SCORE AND STATISTICAL ANALYSIS WERE MADE BY MAXQUANT®, PERSEUS™ AND EXCEL® SOFTWARE. STATISTICAL ANALYSES ARE MADE BY STUDENT TEST (-1.5 ≤ FOLD CHANGE ≥ 1.5) AND FISHER TEST (P-VALUE > 0.05; P-VALUE ≤ 0.05 (*); P-VALUE ≤ 0.01 (**); P-VALUE ≤ 0.001 (***)). P-VALUE ≤ 0.0001 (****). IT'S INDICATED IF THE SLC ARE UPREGULATED OR DOWNREGULATED WITH SIGNIFICANT P-VALUE; IF THE P-VALUE IS NO SIGNIFICANT BUT FOLD CHANGE ARE SIGNIFICANT THE UP OR DOWN REGULATIONS ARE	224

TABLE 10 IMPACT OF IN VIVO ALCOHOL ON TRANSPORTER PROTEIN. PROTEOMIC ANALYSIS OF “ALCOHOL” VILLI (N=5) IN COMPARISON TO “CONTROL” VILLI (N=5) WERE MADE BY 3P5 PROTEOM’IC PLATFORM AT COCHIN HOSPITAL. ANALYSIS OF RELATIVE EXPRESSION/ FOLD CHANGE/ Z-SCORE AND STATISTICAL ANALYSIS WERE MADE BY MAXQUANT®, PERSEUS™ AND EXCEL® SOFTWARE. STATISTICAL ANALYSES ARE MADE BY STUDENT TEST (-1.5 ≤ FOLD CHANGE ≤ 1.5) AND FISHER TEST (P-VALUE > 0.05; P-VALUE ≤ 0.05 (*); P-VALUE ≤ 0.01 (**); P-VALUE ≤ 0.001 (***)). P-VALUE ≤ 0.0001 (****). IT’S INDICATED IF THE SLC ARE **UPREGULATED** OR **DOWNREGULATED** WITH SIGNIFICANT P-VALUE; IF THE P-VALUE IS NO SIGNIFICANT BUT FOLD CHANGE ARE SIGNIFICANT THE UP OR DOWN REGULATIONS ARE 225

TABLE 11- IMPACT OF IN VIVO ALCOHOL ON TRANSPORTER PROTEIN. PROTEOMIC ANALYSIS OF “ALCOHOL” VILLI (N=5) IN COMPARISON TO “CONTROL” VILLI (N=5) WERE MADE BY 3P5 PROTEOM’IC PLATFORM AT COCHIN HOSPITAL. ANALYSIS OF RELATIVE EXPRESSION/ FOLD CHANGE/ Z-SCORE AND STATISTICAL ANALYSIS WERE MADE BY MAXQUANT®, PERSEUS™ AND EXCEL® SOFTWARE. STATISTICAL ANALYSES ARE MADE BY STUDENT TEST (-1.5 ≤ FOLD CHANGE ≤ 1.5) AND FISHER TEST (P-VALUE > 0.05; P-VALUE ≤ 0.05 (*); P-VALUE ≤ 0.01 (**); P-VALUE ≤ 0.001 (***)). P-VALUE ≤ 0.0001 (****). IT’S INDICATED IF THE SLC ARE **UPREGULATED** OR **DOWNREGULATED** WITH SIGNIFICANT P-VALUE; IF THE P-VALUE IS NO SIGNIFICANT BUT FOLD CHANGE ARE SIGNIFICANT THE UP OR DOWN REGULATIONS ARE 226

TABLE 12 IMPACT OF IN VIVO ALCOHOL ON TRANSPORTER PROTEIN. PROTEOMIC ANALYSIS OF “ALCOHOL” VILLI (N=5) IN COMPARISON TO “CONTROL” VILLI (N=5) WERE MADE BY 3P5 PROTEOM’IC PLATFORM AT COCHIN HOSPITAL. ANALYSIS OF RELATIVE EXPRESSION/ FOLD CHANGE/ Z-SCORE AND STATISTICAL ANALYSIS WERE MADE BY MAXQUANT®, PERSEUS™ AND EXCEL® SOFTWARE. STATISTICAL ANALYSES ARE MADE BY STUDENT TEST (-1.5 ≤ FOLD CHANGE ≤ 1.5) AND FISHER TEST (P-VALUE > 0.05; P-VALUE ≤ 0.05 (*); P-VALUE ≤ 0.01 (**); P-VALUE ≤ 0.001 (***)). P-VALUE ≤ 0.0001 (****). IT’S INDICATED IF THE SLC ARE **UPREGULATED** OR **DOWNREGULATED** WITH SIGNIFICANT P-VALUE; IF THE P-VALUE IS NO SIGNIFICANT BUT FOLD CHANGE ARE SIGNIFICANT THE UP OR DOWN REGULATIONS ARE 227

TABLE 13- EFFECT OF IN VIVO ALCOHOL ON MOLECULAR TRANSPORT FUNCTION. ANALYSIS ON PROTEOME OF ALCOHOL VILLI (N=5) IN COMPARISON TO CONTROL VILLI (N=5) WERE MADE BY 3P5 PROTEOM’IC PLATFORM AT COCHIN HOSPITAL. ANALYSIS OF RELATIVE EXPRESSION/ FOLD CHANGE/ Z-SCORE AND STATISTICAL ANALYSIS WERE MADE BY PERSEUS®, MAXQUANT®, EXCEL® AND INGENUITY® SOFTWARE. ANALYSE OF THE IMPACT OF ALCOHOL ON MOLECULAR TRANSPORT: 8 MOLECULAR TRANSPORT FUNCTIONS ARE AFFECTED SIGNIFICATIVELY BY IN VIVO ALCOHOL (P-VALUE < 0.05. FISHER TEST); ONE OF THESE FUNCTIONS IS DOWNREGULATED BY ALCOHOL (-2 > Z-SCORE < 2; NS (STUDENT TEST)). IN TOTAL, 49 PROTEINS OF TRANSPORT ARE ALTERED BY IN VIVO ALCOHOL..... 228

TABLE 14- IMPACT OF IN VIVO ALCOHOL ON FATTY ACID METABOLISM. ANALYSIS ON PROTEOME OF ALCOHOL VILLI (N=5) IN COMPARISON TO CONTROL VILLI (N=5) WERE MADE BY 3P5 PROTEOM’IC PLATFORM AT COCHIN HOSPITAL. ANALYSIS OF RELATIVE EXPRESSION/ FOLD CHANGE/ Z-SCORE AND STATISTICAL ANALYSIS WERE MADE BY MAXQUANT®, EXCEL® AND INGENUITY® SOFTWARE. TABLE OF IN VIVO ALCOHOL EFFECT ON 6 PROTEINS IMPLICATED IN FATTY ACID METABOLISM. RELATIVE PROTEIN EXPRESSIONS OF ACAA1, ACADSB, ACSL4, ACSL5, ALDH1B1, AUH ARE EXPRESSED IN FOLD CHANGE NORMALIZED ON CONTROL. STATISTICAL ANALYSES ARE MADE BY STUDENT TEST (P-VALUE < 0.05) AND FISHER TEST (-1.5 < FC < 1.5)..... 229

TABLE 15 245

TABLE 16 246

TABLE 17 247

TABLE 18	248
TABLE 19-EFFECT OF IN VIVOALCOHOL ON NERVOUS SYSTEM DEVELOPMENT AND FUNCTION. ANALYSIS ON PROTEOME OF ALCOHOL VILLI (N=5) IN COMPARISON TO CONTROL VILLI (N=5) WERE MADE BY 3P5 PROTEOM'IC PLATFORM AT COCHIN HOSPITAL. ANALYSIS OF RELATIVE EXPRESSION/ FOLD CHANGE/ Z-SCORE AND STATISTICAL ANALYSIS WERE MADE BY PERSEUS®, MAXQUANT®, EXCEL® AND INGENUITY® SOFTWARE. 49 MOLECULAR OF NERVOUS SYSTEM DEVELOPMENT AND FUNCTION WERE SIGNIFICATIVELY AFFECTED BY IN VIVOALCOHOL (P-VALUE<0.05. FISHER TEST);.....	252
TABLE 20 EFFECT OF ALCOHOL OF BRAIN LESION. ANALYSIS ON PROTEOME OF ALCOHOL VILLI (N=5) IN COMPARISON TO CONTROL VILLI (N=5) WERE MADE BY 3P5 PROTEOM'IC PLATFORM AT COCHIN HOSPITAL. ANALYSIS OF RELATIVE EXPRESSION/ FOLD CHANGE/ Z-SCORE AND STATISTICAL ANALYSIS WERE MADE BY MAXQUANT®, EXCEL® AND INGENUITY® SOFTWARE. ANALYSE OF THE IMPACT OF ALCOHOL ON ENDOCRINE SYSTEM DISORDERS.149 MOLECULES IMPLICATED IN BRAIN LESION WERE SIGNIFICATIVELY AFFECTED BY IN VIVOALCOHOL, 97 WERE UP-REGULATED (P-VALUE<0.05. STUDENT TEST).....	254
TABLE 21- EFFECT OF IN VIVO ALCOHOL ON FUNCTIONS FOR CANCER. ANALYSIS ON PROTEOME OF ALCOHOL VILLI (N=5) IN COMPARISON TO CONTROL VILLI (N=5) WERE MADE BY 3P5 PROTEOM'IC PLATFORM AT COCHIN HOSPITAL. ANALYSIS OF RELATIVE EXPRESSION/ FOLD CHANGE/ Z-SCORE AND STATISTICAL ANALYSIS WERE MADE BY MAXQUANT®, EXCEL® AND INGENUITY® SOFTWARE. ANALYSE OF THE IMPACT OF ALCOHOL ON ENDOCRINE SYSTEM DISORDERS. 181 MOLECULAR IMPLICATED IN CANCER FUNCTIONS ARE AFFECTED SIGNIFICATIVELY BY IN VIVO ALCOHOL (P-VALUE<0.05. FISHER TEST); 8 DISEASES AND FUNCTIONS PATHWAY ARE ACTIVATED BY ALCOHOL WITH P- VALUE<0.05 (FISHER TEST) AND Z-SCORE> 2 (STUDENT TEST).....	273