



HAL
open science

Etude du CD146 placentaire comme biomarqueur de troubles de l'angiogenèse cérébrale suite à une alcoolisation in utero.

Camille Sautreuil

► **To cite this version:**

Camille Sautreuil. Etude du CD146 placentaire comme biomarqueur de troubles de l'angiogenèse cérébrale suite à une alcoolisation in utero.. Neurosciences [q-bio.NC]. Normandie Université, 2019. Français. NNT : 2019NORMR149 . tel-04844558

HAL Id: tel-04844558

<https://theses.hal.science/tel-04844558v1>

Submitted on 18 Dec 2024

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.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Discipline NEUROSCIENCES

Spécialité ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Etude du CD146 placentaire comme biomarqueur de troubles de l'angiogenèse cérébrale suite à une alcoolisation *in utero*

**Présentée et soutenue par
Camille SAUTREUIL**

**Thèse soutenue publiquement le mardi 17 décembre 2019
devant le jury composé de**

Mme Sophie GIL	Professeur des Universités – Inserm UMR-S1139, Faculté de Pharmacie de Paris, Université Paris Descartes	Rapporteur
M. Vincent LELIEVRE	Professeur des Universités – CNRS UPR 3212 – INCI, Université de Strasbourg	Rapporteur
Mme Géraldine FAVRAIS	Maître de Conférence des Universités – Praticien Hospitalier, Inserm UMR 1253 Service de Néonatalogie, CHRU de Tours, Université de Tours	Examineur
M. Daniel MELLIER	Professeur émérite des Universités – Chargé de mission handicap Laboratoire CRFDP, Université de Rouen Normandie	Examineur
M. Stéphane MARRET	Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, UMR 1245 Chef du Service de Pédiatrie Néonatale et Réanimation – Neuropédiatrie CHU de Rouen, Université de Rouen Normandie	Examineur
M. Bruno GONZALEZ	Directeur de Recherche INSERM, UMR 1245 Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par Monsieur le Dr Bruno GONZALEZ

Laboratoire U1245 – Equipe 4

La thèse n'est pas une fin en soi, mais tout simplement une tranche de vie avec un avant, un pendant et un après. A l'aube de nouvelles perspectives, la vue de l'autre côté a vraiment l'air spectaculaire...

Tout naturellement, je tiens, pour commencer, à remercier mon directeur de thèse, le **Docteur Bruno Gonzalez**. Les travaux présentés dans ce manuscrit n'auraient pas été possible sans ton expertise scientifique, ta patience, tes conseils et ton soutien. Tu t'es toujours montré disponible et compréhensif. Je me rappelle ce jour de mai, le ciel était encombré de *cumulonimbus*, réduisant considérablement ma visibilité. Tu m'as alors dit : *Il vaut mieux avoir des remords que des regrets*. Etant donné le contexte, il y avait quelque chose d'étrange à t'entendre prononcer cette phrase. Avec du recul et Oscar Wilde mis à part, je trouve des qualités à ce sentiment de remord, aussi sombre soit-il. J'ai donc fait en sorte d'adopter une position plus confortable et plus favorable pour apercevoir l'objectif pragmatique, débarrassé de toutes considérations. Tu m'as aidé à prendre la bonne décision et je t'en remercie !

Je remercie chaleureusement le **Pr Sophie Gil** et le **Dr Vincent Lelievre** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon manuscrit de thèse. Un grand merci aussi au **Dr Géraldine Favrais**, au **Pr Daniel Mellier** et au **Pr Stéphane Marret** d'avoir accepté de juger mes travaux de thèse en tant qu'examineurs.

Que serais-je sans ma famille : **mes parents** et **mes deux sœurs**. Sans vous, je ne serais peut-être rien. Merci **Maman**, tu m'as toujours accompagnée dans les moments obscurs qui ont jalonné ma scolarité et nous savons toutes les deux qu'il y en a eu beaucoup trop. Les supporter avec toi a été difficile, les supporter seule aurait été impossible. **Ophélie**, ma grande sœur, tu as joué un rôle si important dans mes choix de vie. La faute à **Williams-Beuren** ! Merci à **Mathilde**, ma petite sœur, avec qui je partage beaucoup de choses. C'est grâce à toi, la biostatisticienne de la famille, que j'ai appris à apprécier les biostatistiques. Malgré les difficultés, j'espère que tu auras le droit à une bonne fin de thèse. **Mathieu**, ça fera 10 ans dans 6 mois ! Et tu as toujours été là pour moi ! Toujours prêt à m'aider, à me rendre service et à me protéger. Nous avons besoin l'un de l'autre. Merci d'avoir très rapidement pris conscience de ce qui se passait, de la situation dans laquelle je me trouvais et d'avoir fait en sorte que j'arrive au bout de cette thèse. Mon tout petit chien, **Mikado**, je te remercie pour tout le réconfort que tu m'apportes chaque jour. Tu as voulu m'aider dans la rédaction de ce manuscrit et même si je n'ai jamais réellement compris ce que tu voulais exprimer par « *Socnem;OcuiuvS* », je suis persuadée que tu y mettais de la bonne volonté, et ça, c'est ce qu'il y a de plus important !

Au **Dr Matthieu Lecuyer**, un très grand merci pour tout ce que tu m'as apporté (au Laboratoire et en dehors). Ton départ a laissé un grand vide. Même à l'autre bout du monde, tu continues à faire partie de ma vie et je ne pourrai pas me passer de ton amitié, de tes conseils et de ton soutien. Je me rends parfois rue des Augustins et j'essaye de retrouver l'ambiance que j'y ai connue mais sans toi, tout est très différent. Tu es de ceux que l'on n'oublie pas. On se voit bientôt à San Francisco ?

Au **Dr Ismael Daher**, merci pour tous les bons moments que j'ai passés en ta présence. Bien que tu sois parti pour de nouvelles aventures, tu reviens souvent nous voir au Laboratoire. Te retrouver autour d'un bon repas est un régal pour le moral. A très vite au *Fujiya car c'est bon ça !*

C'est en partie grâce à ses stagiaires qu'un laboratoire prend vie. Tous les **étudiants** sans exception, avec leur envie d'apprendre et de bien faire, ont été une formidable bouffée d'oxygène. Je pense, en particulier, à ceux qui ne sont pas restés : **Shérine Feillet, Michael Alasoadura, Boubacar Mohamed, Maëlle Fabre** et **Victor Ferment**. Merci à vous.

Parce qu'elles ont participé à ma formation, je tiens à remercier mes stagiaires : **Léa Lebaron, Salomé Mariages, Axelle Houlière** et **Adélaïde Racine**. Vous vous êtes montrées très motivées et vous avez porté un intérêt considérable à tout ce que j'ai pu vous apprendre. Léa, je me suis aperçue au cours du stage que tu aimais vraiment la Recherche, je te souhaite donc beaucoup de réussite dans la poursuite de tes études. **Marie Fredj**, tu as été mon regain d'énergie et de motivation. Je te remercie pour tout ce que tu m'as apporté. Je garde de merveilleux souvenirs de ton passage au laboratoire. Au cours de ton stage, une belle amitié est née et j'espère qu'elle durera très très longtemps. **Coraline Røgiers**, je sais ce que tu as traversé et tu es bien placée pour savoir que l'on ne peut compter que sur soi-même. Pour ton bien, tu as dû prendre une décision difficile et courageuse. Motivée, je sais que tu l'es, alors prends le temps de faire une pause, de soigner tes plaies, et reviens vite dans le jeu car j'ai l'impression que pour toi la partie n'est pas finie.

Je n'oublie pas mes amis des laboratoires voisins pour leur soutien, leur écoute, leur sympathie et pour tous ces supers moments que l'on a partagés : **Tiphaine Henri** (du SCAC), **Tony Noël, Marie Pieronne Deperrois, Matthieu Soulie, Mouad Hamzaoui** (de l'U1096), **Ana Juarez** (de ToxEMAC) et beaucoup d'autres. Merci à **l'intégralité du personnel de l'animalerie centrale** et à son responsable, **Yann Lacoume**, vous avez su vous adapter à la situation, à ma situation. Vous avez grandement facilité mes déplacements au sein de l'animalerie et avez

répondu à mes besoins en termes d'accessibilité, avec attention et compréhension, et sans complication. **Ronald Huot, Cédric Bossé, Romain Blanchard, Tony Noël**, je tiens aussi à vous remercier pour tous ces supers moments passés à la cafétéria tôt le matin, où j'ai beaucoup ri ! J'en garderai de très bons souvenirs.

Je tiens à remercier le **Dr Céline Derambure** pour m'avoir initiée à la transcriptomique et pour le temps qu'elle a consacré à la réalisation de notre étude collaborative. Merci pour ton enthousiasme, ton investissement et ton dynamisme !

Je remercie le **Dr Pascal Hilber**, qui m'a formé à l'enseignement, pour sa gentillesse, ses conseils, ses anecdotes. Jamais je ne me serais crue capable de me retrouver en tant qu'enseignante dans une salle remplie d'étudiants. Pourtant, je l'ai fait et j'espère que l'occasion se représentera car ça a été un réel plaisir.

Un merci particulier au **Dr Benoit Delaporte**, au **Pr Lionel Cazin** et à **Anaëlle Leroy**. Vous avez joué un rôle très important dans la poursuite de mes études et, par conséquent, dans la réalisation de cette thèse.

Merci à tous les membres du Laboratoire qui ont été là pendant toute la durée de la thèse. Je pense à mes collègues doctorantes : **Bérénice Le Dieu-Lugon** (toujours prête à rendre service) avec qui j'ai partagé beaucoup plus que mon bureau pendant trois années. Nous avons fait notre Licence et notre Master ensemble, nous avons commencé notre Doctorat ensemble et nous allons, à quelques jours près, soutenir notre thèse ensemble. Le temps est arrivé où nos chemins professionnels vont devoir se séparer, non sans une certaine émotion. Je te souhaite plein de belles choses pour la suite ! Merci à **Marion Dumanoir** et **Mélanie Brosolo** pour nos discussions autour de nos projets respectifs et à qui je souhaite une bonne fin de thèse. **Lou Legouez**, dernière doctorante arrivée, je te souhaite de faire une belle thèse et de bien vivre ces trois prochaines années.

Certains pensent que la discrétion est un défaut à combattre. Je pense, au contraire, qu'il s'agit d'une grande qualité enviée par ceux qui ne savent pas la pratiquer. Aussi, pour leur discrétion et leur bienveillance, je remercie chaleureusement les **Drs Carine Cleren, Natalie Dourmap, Philippe Leroux**, notre toute jeune retraitée le **Pr Isabelle Leroux-Nicollet**, et **François Janin**.

Je tiens à remercier le **Dr Nicolas Dupré**, récemment parti. J'ai découvert quelqu'un de *fun*, un véritable génie créatif amateur d'œuvres d'art contemporain, sachant manier avec dextérité surligneurs, *scotch*, vis, écrou, LEGO® et équerres. J'ai beaucoup aimé ton illustration du chat

de Schrödinger. Plus sérieusement, merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur, et ta capacité à arrondir les angles. Merci aussi au **Dr Carole Brasse-Lagnel**, avec qui j'ai passé une demi-journée scientifiquement intéressante et enrichissante à Paris Descartes. Merci à **Michelle Hauchecorne**, à **Céline Lesueur** et au **Dr Cécile Léger**.

Dans un monde où les jeux d'acteur sont sophistiqués, l'immersion est certainement la clé pour accéder à la perception de la réalité telle qu'elle est, avec sa part de conformisme. Parce qu'un malheureux oublié risque de créer une situation délicate, j'ai décidé de briser les chaînes de la convenance et de remercier les **personnes** compliquées que j'ai eu la chance (en quelque sorte) de rencontrer car vous êtes le parfait exemple de ce que je ne veux pas être.

Enfin, je remercie le **monte-charge** pour m'avoir offert d'innombrables pauses forcées. Saviez-vous que 7 secondes séparent chacun des étages ? Entre le rez-de-chaussée et le 3^{ème} étage, il y a 21 secondes. Sachant que j'ai pu emprunter le monte-charge au minimum 4 fois par jour, nous arrivons à une moyenne basse de 82 secondes, soit 1 minute et 22 secondes ; la moyenne haute se situant plutôt aux alentours des 189 secondes, soit 3 minutes 09. Or, j'ai passé, en moyenne, 3 ans au Laboratoire, soit 915 journées. En multipliant 915 par 3 minutes 02, nous arrivons à un résultat de 2882 minutes et 25 secondes, soit 2 jours environ. Alors, *mon ami*, je te remercie de m'avoir accueilli et de m'avoir offert 2 journées de « pause » sur ces trois années de thèse.

Pour clore cette partie, la plus difficile à écrire, je tiens à remercier celles et ceux que je n'ai pas cités et qui ont participé, d'une manière ou d'une autre, à l'élaboration de ce travail.

Sommaire

Production scientifique
 Résumé
 Abstract
 Liste des abréviations
 Liste des figures et des tables

Chapitre 1	1
Introduction	1
1. Développement du système nerveux central	3
1.1. Différenciation du tube neural et formation des vésicules céphaliques	3
1.2. Histogenèse du tube neural	5
1.3. Développement du télencéphale et mise en place du cortex cérébral	7
1.3.1. Mise en place des neurones au sein du cortex cérébral.....	8
1.3.2. Mise en place des cellules gliales au sein du cortex cérébral	10
1.4. Développement de la vascularisation cérébrale	11
1.4.1. Mise en place de la circulation cérébrale	11
1.4.2. Mécanismes cellulaires de l'angiogenèse	12
1.5. Interactions entre systèmes vasculaire et cérébral.....	15
2. La famille du VEGF/PlGF : des acteurs de l'angiogenèse.....	18
2.1. La famille du VEGF	19
2.1.1. Le VEGF-A.....	19
2.1.2. Les VEGF-B, -C, -D, -E et -F	20
2.1.3. Le PlGF	21
2.2. Les récepteurs du VEGF et du PlGF	22
2.2.1. Les VEGF-R1, -R2 et -R3 : généralités	22
2.2.2. Les VEGF-R1, -R2 et -R3 : structure et fonctions.....	24
2.3. Les co-récepteurs.....	24
2.3.1. Les neuropilines	25
2.3.2. Le CD146 : un co-récepteur de VEGF-R2.....	25
3. Le placenta : une source de facteur pro-angiogénique	31
3.1. Le développement du placenta humain	31
3.1.1. Implantation embryonnaire et formation de la villosité chorale	31
3.1.2. La différenciation trophoblastique	33
3.2. Mise en place de la circulation fœto-maternelle et remodelage des artères spiralées utérines	34
3.2.1. Mise en place de la circulation fœto-placentaire	34

3.2.2.	Mise en place de la circulation maternelle.....	34
3.2.3.	Régulation moléculaire de l'angiogenèse placentaire.....	35
3.3.	Comparaison entre le placenta humain et le placenta murin.....	36
3.4.	Impact d'une alcoolisation maternelle sur le placenta	37
3.4.1.	Le placenta, une surface d'échanges materno-fœtale	37
3.4.2.	Anomalies placentaires rencontrées lors d'une alcoolisation maternelle durant la grossesse.....	39
4.	Effet de l'alcoolisation <i>in utero</i> sur la neurogenèse et l'angiogenèse.....	41
4.1.	Le syndrome d'alcoolisation fœtale (SAF) et l'ensemble des troubles causés par l'alcoolisation fœtale (ETCAF).....	41
4.1.1.	Historique.....	41
4.1.2.	La description d'un syndrome.....	42
4.1.3.	Ensemble des troubles causés par l'alcoolisation fœtale	43
4.2.	Influence de l'alcool sur le développement cérébral.....	46
4.2.1.	Physiopathologie de l'exposition prénatale à l'alcool	46
4.2.2.	Sensibilité du cerveau en cours de développement.....	47
4.2.3.	Impact d'une exposition prénatale à l'alcool sur la neurogenèse et l'angiogenèse cérébrale	48
4.2.4.	Cibles cellulaires et moléculaires des effets cérébraux de l'alcool.....	50
Chapitre 2	53
Hypothèse et Objectifs	53
Chapitre 3	57
Résultats	57
Etude 1	59
Etude 2	75
Chapitre 4	109
Discussion et perspectives	109
Références bibliographiques	127

Production scientifique

Publications

- **Sautreuil C.**, Laquerrière A., Lecuyer M., Brasse-Lagnel C., Jégou S., Bekri S., Marcorelles P., Gil S., Marret S., Gonzalez BJ.
« *Alcoolisation Fœtale : le placenta au secours du diagnostic précoce des troubles du développement cérébral de l'enfant* ». Accepté dans médecine/sciences 2019
- **Sautreuil C.**, Lecointre M., Dalmasso J., Dumanoir M., Leuillier M., Lecuyer M., Marret S., Brasse-Lagnel C., Gil S., Gonzalez BJ.
« *Impaired expression of the angiogenic placental factor CD146 by in utero alcohol exposure alters the fetal brain vasculature* ». En cours de soumission
- **Sautreuil C.**, Derambure C., the AlcoBrain ANR consortium, Marret, S., Gonzalez BJ.
« *Effect of prenatal alcohol exposure on the angiogenic “Placenta-Brain” signature: a transcriptomic analysis* ». En préparation

Communication orale

- Lecuyer M., Laquerrière A., Bekri S., Lesueur C., Ramdani Y., Jégou S., Uguen A., Marcorelles P., Marret Gonzalez BJ. PIGF, a placental marker of fetal brain defects after in utero alcohol exposure. **LARC Neurosciences 2017 Lille.**
Prix FHU

Communications affichées

L'orateur est souligné.

- **Sautreuil C.**, Lecuyer M., Lecointre M., Dumanoir M., Brasse-Lagnel C., Jégou S., Marret S., Gonzalez BJ. CD146, a placental protein involved in the cortical angiogenesis impairments induced by *in utero* alcohol exposure. **BNA 2019 Dublin**
- **Sautreuil C.**, Lecuyer M., Lecointre M., Jégou S., Marret S., Gonzalez BJ. Placental CD146 is involved in the cortical angiogenesis impairments induced by prenatal alcohol exposure. **JED 2019 Caen**
- **Sautreuil C.**, Lecointre M., Jégou S., Lesueur C., Marret S., Lecuyer M., Gonzalez BJ. Placental CD146 is involved in the control of fetal brain vasculature and in the deleterious effects of alcohol on the cerebral cortex vasculature. **LARC Neurosciences 2018 Rouen**
- **Sautreuil C.**, Lecointre M., Jégou S., Lesueur C., Marret S., Lecuyer M., Gonzalez BJ. Involvement of placental CD146 in the cortical angiogenesis impairments induced by *in utero* alcohol exposure. **JNRB 2018 Rouen**
- Lecuyer M., Laquerrière A., Jégou S., **Sautreuil C.**, Bekri S., Marcorelles P., Marret S., **Gonzalez BJ.** PIGF, a placental biomarker for early diagnosis of FASD brain defects. **RSA 2018 San Diego**
Sautreuil C., Lecointre M., Jégou S., Lesueur C., Marret S., Gonzalez BJ., Lecuyer M. Placental CD146 is involved in the cortical angiogenesis impairments induced by *in utero* alcohol exposure. **JNRB 2017 Caen. Communication Primée**

- Dumanoir M., **Sautreuil C.**, Lecointre M., Cipriani S., Léger C., Fabre M., Hauchecorne M., Gressens P., Boulday G., Tournier-Laserve E., Marret S., Gonzalez BJ., Brasse-Lagnel C. Effect of prenatal alcohol exposure (PAE) on the retinal vascular network: involvement of the CD146 protein. **JNRB 2017 Caen.**
- **Sautreuil C.**, Lecointre M., Jégou S., Lesueur C., Marret S., Gonzalez BJ., Lecuyer M. In utero alcohol exposure: effect of placental CD146 repression on brain VEGF-R2 expression and cortical vasculature. **JED 2017 Le Havre**
- **Sautreuil C.**, Jégou S., Lesueur C., Vezain M., Saugier-Veber P., Marret S., Gonzalez BJ., Lecuyer M. *In utero* alcohol exposure: effect of placental CD146 repression on brain VEGF-R2 expression and cortical vasculature. **JNRB 2016 Rouen**

Enseignements

Mission d'enseignement 2017-2018 (64h) – Université des Sciences et Techniques de Rouen.

- Niveau Licence 2 : TP de physiologie animale et TD de neuroendocrinologie

Encadrement de stagiaires

Encadrement de **6** stagiaires dont :

- **4** en BTS Analyses Agricoles Biologiques et Biotechnologiques : Léa Lebaron, Salomé Mariages, Axelle Houlière, Adelaïde Racine. Durée : 2 semaines
- **1** en 2^{ème} année de Licence Biologie, Géosciences, Environnement, option Sciences de la Vie : Marie Fredj. Durée : 2 semaines
- **1** en 1^{ère} année de Master Neurosciences : Coraline Røegiers. Durée : 3 mois

Formations

- Formation « Chirurgie expérimentale – Mammifères » (2019)
- Formation « Des outils innovants au service de vos animaux et de votre recherche » (2019)
- Formation « Atelier génétique et animalerie de l'AfstA1 » (2019)
- Formation « Règles et usages de publication d'un article scientifique » (2019)
- Formations à l'école supérieure du professorat et de l'éducation (ESPE ; 2017-2019) :
 - « Analyse en groupe des situations professionnelles »
 - « Appréhender avantages et limites de l'empathie »
 - « Accueillir des doctorants chez les enseignants »
 - « Voix parlée : les enjeux d'une voix correctement posée »
 - « Participer à un *escape game* afin de se sensibiliser à l'innovation pédagogique dans l'enseignement »
 - « Faire réussir et motiver les étudiants : freins et leviers »

- « Accueillir des étudiants handicapés à l'Université : cadre institutionnel et adaptations pédagogiques »
- « Evaluer les étudiants : les modalités, la pertinence et les enjeux pédagogiques »
- Formation « Séminaire des doctorants à Bruxelles et visite de la commission Européenne » (2018)
- Formation « Initiation à la lecture rapide » (2017)
- Formation « Expérimentation animale – Conception et réalisation de procédures expérimentales » (2017)
- Formation « Mener sa thèse comme un projet » (2016)
- Formation « Hygiène et sécurité – risques biologiques et expérimentation animale » (2016)
- Formation « Biostatistiques » (2016)

Résumé

Le Syndrome d'Alcoolisation Fœtale (SAF) est l'atteinte la plus sévère des Troubles Causés par l'Alcoolisation Fœtale (TCAF). Il se traduit, chez l'enfant, par une triade de manifestations cliniques (dysmorphies craniofaciales, retard de croissance pré et postnatal, troubles neurologiques et comportementaux). Toutefois, en raison de l'absence d'anomalies morphologiques évidentes, la plupart des enfants TCAF échappent à un diagnostic précoce. Pour autant, ces enfants ne sont pas dépourvus d'atteintes cérébrales et les conséquences neurodéveloppementales et comportementales se révéleront progressivement avec l'âge. Le défi, pour les cliniciens, consiste donc à diagnostiquer au plus tôt ces enfants TCAF afin de mettre en place un accompagnement adapté à une période (0-5 ans) où le potentiel de récupération est important.

A ce jour, même s'il existe des biomarqueurs d'exposition à l'alcool, ces derniers ne permettent pas de déterminer s'il y a eu une atteinte cérébrale. De récents travaux menés au Laboratoire ont mis en évidence l'existence d'un lien fonctionnel « Placenta-Cerveau » impliqué dans le contrôle de l'angiogenèse corticale du fœtus. Ainsi, le PIGF a été identifié comme un premier biomarqueur placentaire d'atteinte cérébrale et une procédure de valorisation a été engagée. Mon projet de thèse a consisté à rechercher si un autre facteur pro-angiogénique placentaire associé au signalosome du PIGF/VEGF, le CD146, pouvait également constituer un acteur de la dysfonction Placenta-Cerveau suite à l'exposition *in utero* à l'alcool. De plus, une approche sans *a priori* par analyse transcriptomique inter-organes a également été initiée pour tenter d'élargir la signature « angiogénique » des effets délétères de l'alcool sur la communication entre ces deux organes.

Concernant l'étude sur le CD146, les données obtenues sur des extraits de villosités de placenta humain montrent que le profil d'expression des ARNm codant le CD146 ne varie pas à différents stades gestationnels. En revanche, l'étude du profil protéique par la technique de Western blot indique une augmentation marquée de l'expression de la forme membranaire du CD146 avec le terme, et la forme soluble du CD146 est clairement détectée. Chez la Souris, les profils d'expression ARNm et protéique au niveau placentaire sont comparables à ceux caractérisés chez l'humain. L'immunohistochimie indique que l'expression du CD146 est endothéliale. De plus, les résultats obtenus par une approche ELISA indiquent que le sCD146 est détecté dans le sang céphalique fœtal. Dans le cerveau, le CD146 est beaucoup moins exprimé que dans le placenta, et la forme membranaire est majoritaire. L'alcoolisation *in utero* perturbe les expressions placentaire et cérébrale de la forme soluble de CD146 en la diminuant fortement dans le placenta et en l'augmentant dans le cerveau fœtal. De plus, certains éléments

du signalosome du CD146 ont une expression qui est inversement altérée entre le placenta et le cerveau. Enfin, la répression placentaire du CD146 par l'électroporation de CRISPR-Cas9 entraîne une désorganisation du réseau microvasculaire cortical comparable à celle observée suite à une exposition *in utero* à l'alcool.

En complément de l'étude ciblée sur le CD146, une étude sans *a priori* a été menée par analyse transcriptomique. Les résultats indiquent que l'alcoolisation *in utero* affecte peu, quantitativement, la signature transcriptomique « Placenta-Cerveau ». Toutefois, l'alcoolisation se traduit par l'émergence de populations géniques qui sont soit spécifiquement présentes dans le groupe « Contrôle » ou dans le groupe « Alcool ». Une analyse qualitative GO orientée « Angiogenèse » a permis d'identifier une liste de gènes dont le profil d'expression « Placenta-Cerveau » est significativement impactée par l'alcool. Une étape de validation de certains de ces gènes va être engagée.

En conclusion, l'approche ciblée réalisée sur le CD146 conforte l'existence d'une interaction fonctionnelle entre le placenta et le cerveau fœtal dans le contrôle de l'angiogenèse. Le CD146 pourrait ainsi constituer un autre biomarqueur placentaire d'atteintes du développement cérébral de l'enfant exposé *in utero* à l'alcool. De plus, l'approche transcriptomique analysée sous l'angle d'une atteinte de l'angiogenèse devrait permettre d'étoffer la signature des effets neurodéveloppementaux induits par l'alcool et impliquant une dysfonction Placenta-Cerveau. Cette nouvelle génération de biomarqueurs serait précieuse pour le diagnostic précoce des enfants TCAF.

Abstract

Fetal Alcohol Syndrome (FAS) refers to the most severe expression of Fetal Alcohol Spectrum Disorder (FASD). It associates several clinical defects such as craniofacial dysmorphism, growth retardation and neurological/behavioral disabilities. However, due to the absence of obvious dysmorphic features, most children with FASD are late or misdiagnosed. Nevertheless, these infants are not devoid of neurodevelopmental impairments and neurobehavioral troubles that will progressively appear with age. Consequently, the challenge for clinicians consists in the early diagnosis of FASD to avoid the loss of precious years of care.

Even if several biomarkers of alcohol exposure have been characterized, there are currently no biomarkers of brain defects. Recent data from the Laboratory have shown a functional link “Placenta-Brain” involved in the control of the fetal cortical angiogenesis. Thus, PIGF has been identified as a first placental biomarker of brain impairments, and a valorization process has been initiated. My thesis project consisted to research if another placental proangiogenic factor associated to the VEGF/PIGF signalosome could also be an actor of the Placenta-Brain dysfunction induced by *in utero* alcohol exposure. Moreover, a non-oriented trans-organ transcriptomic approach has also been initiated trying to broaden the “angiogenic” signature of the alcohol-induced deleterious effects on the placenta-brain axis.

About the CD146 study, data obtained on villous extracts from human placentas showed that the expression profile of mRNA didn't changed between gestational weeks. However, Western blot analyses showed a marked increase of the expression of the membrane form (mCD146) with term and the soluble form sCD146 was clearly detected. In mouse, the mRNA and protein expression profiles in the placenta were very similar to those characterized in human. Immunohistochemistry indicated that the CD146 expression is at least endothelial. Moreover, results obtained by ELISA indicated that the sCD146 is detected in the fetal cephalic blood. In the mouse brain, the expression of CD146 was much less expressed than in the placenta and mCD146 is the main form. *In utero* alcohol exposure disrupted the expression of sCD146 decreasing in the placenta and increasing in the fetal brain. Additionally, several members of the CD146 signalosome were inversely impacted by alcohol between the placenta and the fetal brain. Finally, the placental repression of CD146 by *in utero* electroporation of CD146 CRISPR-Cas9 plasmids resulted in a disorganization of the microvascular cortical network, similar to the one observed after an *in utero* alcohol exposure.

In addition to the first study focused on CD146, a non-oriented transcriptomic approach was undertaken to investigate the effects of alcohol on the placenta-brain interactions. Results indicated that *in utero* alcohol exposure have quantitatively a little impact on the “Placenta-

Brain” transcriptomic signature. Nevertheless, alcohol exposure induced specific dysregulations of genes representative of the placenta/brain axis and a qualitative GO analysis using the “angiogenesis” filter allowed us to identify a list of genes significantly impaired. A validation step is now planned. To conclude, the targeted approach done on CD146 supports the existence of a functional placenta-fetal brain interaction and involved in the control of angiogenesis. The CD146 could constitute another placental biomarker of brain development defects induced by *in utero* alcohol exposure. Moreover, the transcriptomic approach has provided promising data regarding angiogenesis dysfunction and neurodevelopmental troubles and it would contribute to the characterization of a transcriptomic signature for the early diagnosis of FASD.

Liste des abréviations

-A-

AA98	anticorps anti-CD146
ADAM	<i>a disintegrin and metalloprotease</i>
ADH	alcool déshydrogénase
AKT	protéine kinase B
Amot	<i>angiomotin</i>
Ang	angiopoiétine
ATP	adénosine-triphosphate
aRG	cellules apicales de la glie radiaire
ARN	acide ribonucléique
AS	artère spiralée

-B-

Bcl-xL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BHE	barrière hémato-encéphalique
BMPs	<i>bone morphogenetic proteins</i>
BrdU	bromodésoxyuridine
BRG	cellules basales de la glie radiaire

-C-

CD	cellule déciduale
CD146	<i>cluster of differentiation 146</i>
CD44v6	<i>cluster of differentiation 44 variant 6</i>
COX	<i>cyclooxygenase</i>
CP	plaque corticale
CSL	<i>vertebrate CBF/RBP-jk, Drosophila Su(H), and C. elegans Lag-1</i>
CT	cytotrophoblaste
CTEV	CT extravilleux
CTG	cellule trophoblastique géante
CTP	cytidine tri phosphate
CTV	CT villeux
Cxcr4	<i>chemokine (C-X-C motif) receptor</i>
CYT	domaine cytoplasmique

-D-

D	décidue
Dll4	<i>delta-like ligand 4</i>

-E-

E	épiderme
EB	bouton embryonnaire
EIV	espace intervilleux
EM	mésenchyme embryonnaire
eNOS	<i>endothelial Nitric Oxide Synthase</i>
ERM	<i>ezrin-radixin-moesin</i>
Erk	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>

EU épithélium utérin
EX jour embryonnaire X

-F-

F-actin *filamentous actin*
FADD *fas-associated death domain protein*
FGF *fibroblaste growth factor*
Flk-1 *fetal liver kinase 1*
Flt-X *fms-related tyrosine kinase X*

-G-

GABA *gamma-aminobutyric acid*
GluN(x) sous unité GluN(x) du récepteur NMDA
Glut transporteur de glucose
GN gouttière neurale

-H-

H₂O monoxyde de dihydrogène
H₂O₂ peroxyde d'hydrogène
HEMCAM *hemopoetic cell adhesion molecule*
HGF *hepatocyte growth factor*
hPL hormone lactogène placentaire

-I-

IC intracellulaire
IFN interféron
IgG *immunoglobulin G*
IL *interleukin*
IP *interferon gamma-induced protein*
IP progéniteur intermédiaire
IP-10 *inducible protein-10*
ISVZ *inner subventricular zone*
IZ *intermediate zone*

-K-

K potassium

-L-

L lacune
IgCD146 *long form of CD146*
LV ventricule latéral

-M-

MCAM *melanoma cell adhesion molecule*
MCP *monocyte chemoattractant protein*
MEC matrice extracellulaire
MEOS système microsomal d'oxydation de l'éthanol
Mg²⁺ magnésium

MMP *matrix-metalloproteinase*
MUC18 *mucin 18*
MZ *marginal zone*

-N-

N *notochorde*
Na⁺ *sodium*
NAD⁺ *nicotinamide adénine dinucléotide*
NADH *hydrure de nicotinamide adénine dinucléotide*
NADPH *hydrure de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate*
NMDA *N-methyl-D-aspartate*
NOS *nitric oxide synthase*
NRPs *neuropiline (1 et 2)*

-O-

OPC *oligodendrocyte progenitor cell*
OSVZ *outer subventricular zone*

-P-

P130^{cas} *Crk-associated substrate*
PAI *plasminogen activator inhibitor*
PDGF *platelet endothelial cell adhesion molecule*
PECAM *platelet endothelial cell adhesion molecule*
PGF *placental growth factor*
PGH *hormone de croissance placentaire*
PKC *protein kinase C*
PIGF *placental growth factor*
PN *plaque neurale*
PS-1 *préséniline-1*

-Q-

qRT-PCR *quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*

-R-

RCIU *retard croissance intra utérin*
RMS *rostral migratory stream*

-S-

S *somite*
SAF *syndrome d'alcoolisation fœtale*
sCD146 *soluble form of CD146*
sdf-1 *stromal-derived factor-1*
sFlt-1 *soluble form of Flt-1*
shCD146 *short form of CD146*
SN *sillon neural*
SNC *système nerveux central*
SpT *cellule progénitrice des STG*
ST *syncytiotrophoblaste*

sVEGF-R1 *soluble form of VEGF-R1*
svVEGF *snake venom VEGF*
SVZ *subventricular zone*

-T-

TCAF *troubles causés par l'alcoolisation fœtale*
TDNLA *troubles neurodéveloppementaux liés à l'alcool*
TGF *transforming growth factor*
TIMPs *tissue inhibitors of MMP*
TM *domaine transmembranaire*
TN *tube neural*
TNF *tumor necrosis factor*
TRITC *tetramethylrhodamine*
TSP *thrombospondin*

-V-

VC *villosité chorale*
VE-cadherin *vascular endothelial cadherin*
VEGI *vascular endothelial growth inhibitor*
VEGF *vascular endothelial growth factor*
VEGF-R *VEGF receptor*
VF *villosité flottante*
VP *villosité primaire*
VPF *vascular permeability factor*
VZ *ventricular zone*

-W-

Wnt *wingless integration site*

-Z-

ZO-1 *Zonula Occludens 1*

Liste des figures et des tables

-Liste des figures-

Figure 1 : Formation du tube neural (en coupe frontale) et des vésicules cérébrales primitives et secondaires.....	4
Figure 2 : Différenciation des différents types cellulaires cérébraux à partir des structures du tube neural.....	6
Figure 3 : Développement du cortex cérébral dans le cerveau humain.....	8
Figure 4 : La vasculogénèse et les deux types d’angiogénèse.....	12
Figure 5 : Caractérisation phénotypique de la cellule endothéliale lors du processus d’angiogénèse.....	13
Figure 6 : Les cellules endothéliales, rôle de support à la migration neuronale.....	16
Figure 7 : Mécanisme dirigeant la migration des OPCs le long des microvaisseaux au cours du développement cérébral.....	17
Figure 8 : Illustration de la voie de migration rostrale chez la souris adulte.....	17
Figure 9 : Isoformes du VEGF.....	20
Figure 10 : Isoformes du PlGF.....	22
Figure 11 : Représentation schématique des récepteurs de la famille du VEGF et de leurs ligands respectifs.....	23
Figure 12 : Illustration de la structure protéique des isoformes longue et courte du CD146 humain et murin.....	26
Figure 13 : Schéma illustrant les interactions entre le récepteur VEGFR-2 et son co-récepteur CD146.....	28
Figure 14 : Schéma résumant le mécanisme d’action de CD146 soluble dans les cellules endothéliales.....	29
Figure 15 : Représentation schématique des principaux stades du développement placentaire.....	32
Figure 16 : Principales voies de différenciation du cytotrophoblaste humain.....	33
Figure 17 : La circulation sanguine du placenta.....	35
Figure 18 : Comparaison anatomique des placentas humain et murin.....	37
Figure 19 : Principaux types de transport placentaire permettant les échanges entre la mère et le fœtus.....	38
Figure 20 : Le placenta, source de biomarqueurs de troubles du développement cérébral.....	40
Figure 21 : Gravure « <i>Gin Lane</i> » de William Hogarth, publiée en 1751 dans le cadre de la campagne pour la répression et le contrôle de la vente et de la consommation du Gin.....	41

Figure 22 : Ensemble des troubles causés par l'alcoolisation fœtale.....	44
Figure 23 : Prévalence globale parmi la population générale de la consommation d'alcool au cours de la grossesse et de SAF en 2012.....	45
Figure 24 : Voies de dégradation de l'éthanol dans le foie.....	46
Figure 25 : Représentation des risques d'une exposition prénatale à l'alcool en fonction des périodes de développement des différents organes.....	47
Figure 26 : Illustration des effets d'une exposition prénatale à l'alcool sur la face chez l'Homme et chez la Souris.....	48
Figure 27 : Carte <i>Brainspan</i> comparant les profils d'expression de CD146, VEGF-A, VEGF-B et PGF dans le cerveau humain à partir de la huitième semaine de gestation (SG8) jusqu'à l'âge adulte.....	116
Figure 28 : Visualisation, par Western blot, de l'expression du CD146 et de sa forme soluble, le sCD146, dans le placenta et dans le cortex cérébral à E20.....	116
Figure 29 : Protocole expérimental de l'approche transcriptomique comparative « Placenta-Cerveau ».....	120
Figure 30 : Identification des transcrits différemment exprimés entre le cortex et le placenta à E20 dans le groupe « Contrôle ».....	121
Figure 31 : Identification des transcrits différemment exprimés entre le cortex et le placenta à E20 dans le groupe « Alcool ».....	122
Figure 32 : Analyse comparée de l'effet d'une alcoolisation <i>in utero</i> sur le nombre de sondes géniques significativement sous et surexprimées entre le cortex fœtal et le placenta à E20.....	123
Figure 33 : Analyse GO <i>angiogenesis</i> des sondes géniques significativement sous et surexprimées entre le cerveau fœtal et le placenta des groupes « Contrôle » et « Alcool » à E20.....	124

-Liste des tables-

Table 1 : Activateurs et inhibiteurs de l'angiogénèse.....	18
Table 2 : Tableau récapitulatif du passage de l'alcool ingéré de la mère au fœtus chez la femme.....	42
Table 3 : Exemple de travaux de la littérature illustrant les atteintes du développement cérébral associées à une alcoolisation <i>in utero</i> dans des modèles animaux.....	112

Chapitre 1

Introduction

1. Développement du système nerveux central

1.1. Différenciation du tube neural et formation des vésicules céphaliques

La morphogenèse du système nerveux est un événement précoce de l'embryogenèse des vertébrés. Chez l'Homme, elle débute au cours de la troisième semaine du développement embryonnaire lorsqu'un feuillet embryonnaire primitif – le mésoderme – s'invagine entre les deux feuillets déjà existants. L'embryon qui n'était alors qu'un disque didermique se présente dorénavant sous la forme d'un disque tridermique composé de trois feuillets primordiaux : un feuillet dorsal (l'ectoderme), un feuillet intermédiaire (le mésoderme) et un feuillet ventral (l'endoderme).

Le système nerveux des vertébrés est induit lors de la gastrulation et naît d'interactions entre le mésoderme dorsal et l'ectoderme qui le recouvre. Depuis les expériences originelles de Spemann et Mangold, de très nombreuses études se sont attachées à identifier les molécules impliquées dans l'induction neurale [1, 2]. A titre d'exemple, nous savons aujourd'hui que trois protéines (*Noggin*, *Chordin* et *Follistatin*) synthétisées dans l'organisateur de Spemann contribuent à l'induction neurale. Ainsi, en limitant le champ d'action des *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs), *Noggin*, *Chordin* et *Follistatin* lèvent l'inhibition de la spécification neurale.

En revanche, lorsque ces trois protéines sécrétées n'interfèrent pas avec la voie de transmission du signal BMP₄, le maintien de l'expression de BMP₄ oriente l'ectoderme vers une différenciation épidermique [3, 4]. Aussi, dans ce modèle de différenciation par défaut, l'ectoderme évolue selon deux possibilités en fonction des facteurs avec lesquels il interagit (ou en fonction de la concentration et de la combinaison de ces protéines). Sur le côté ventral, l'ectoderme se différencie en tissu épidermique alors que sur le côté dorsal, l'ectoderme se transforme en neurectoderme. Cette transformation signe la fin de la gastrulation et les prémices de la neurulation.

¹Smith et Slack, **1983**, Journal of Embryology and Experimental Morphology

²Harland, **1994**, Current Opinion in Genetics and Development

³Wilson et Hemmati-Brivanlou, **1995**, Nature

⁴Sasai *et al.*, **1995**, Nature

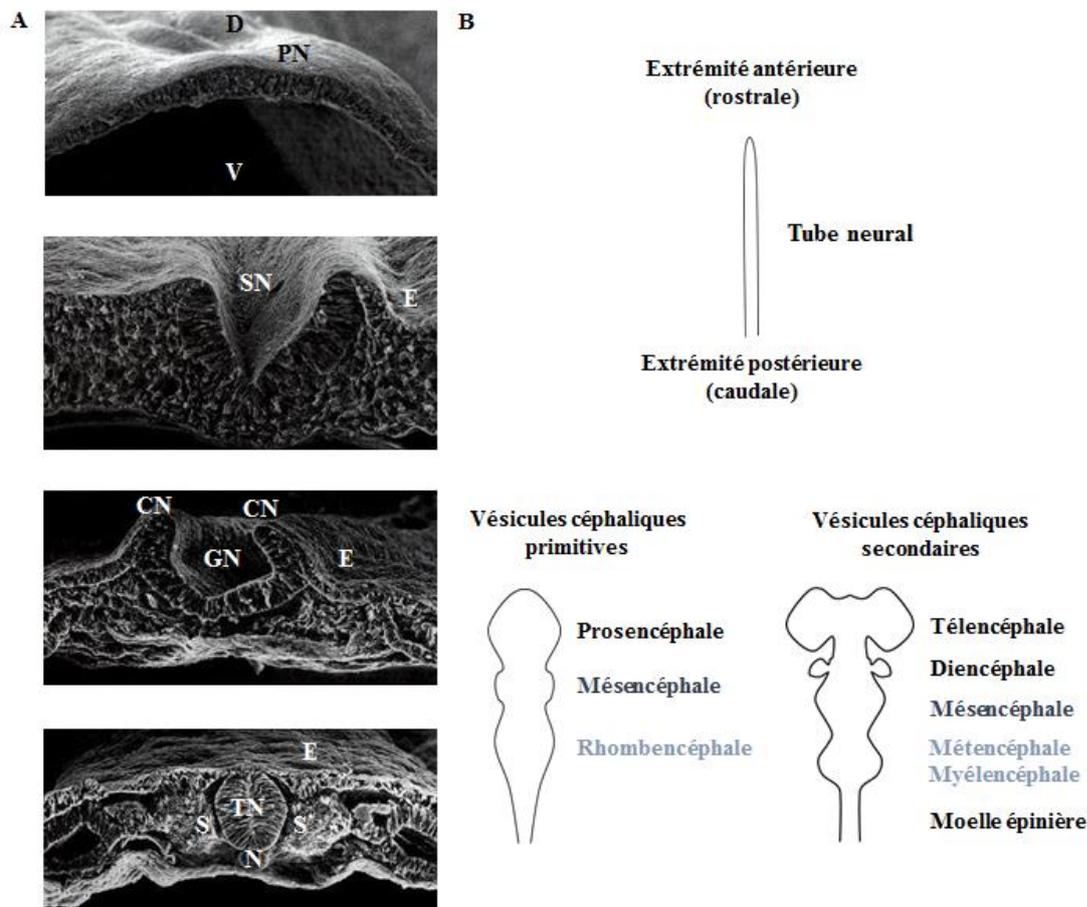


Figure 1 : Formation du tube neural (en coupe frontale) et des vésicules cérébrales primitives et secondaires. (A) La neurulation débute avec la formation de la plaque neurale qui se creuse pour former la gouttière neurale. La gouttière neurale s’invagine ensuite, se ferme et forme le tube neural. **(B)** Le tube neural se subdivise en prosencéphale, en mésencéphale et en rhombencéphale. La moelle épinière se différencie à partir de l’extrémité postérieure du tube neural. Ultérieurement, ces vésicules, à l’exception du mésencéphale, vont subir une seconde segmentation aboutissant à l’apparition des vésicules cérébrales secondaires. Le prosencéphale se divise en télencéphale et en diencéphale et le rhombencéphale se divise en métencéphale et en myélocéphale. CN : crête neurale, D : dorsal, E : épiderme, GN : gouttière neurale, N : notochorde, PN : plaque neurale, S : somite, SN : sillon neural, TN : tube neural. D’après Smith et Schoenwolf, 1997 [5].

La neurulation est amorcée par l’épaississement de l’épithélium neurectodermique qui va dessiner la plaque neurale (**Figure 1**). Celle-ci est bordée par des bourrelets neuraux. Même si la plaque neurale ne constitue à ce stade qu’une ébauche du système nerveux, elle possède déjà un axe antéro-postérieur et un axe médio-latéral. Au 20^{ème} jour embryonnaire (E20), la plaque neurale accentue sa plicature pour former la gouttière neurale. Progressivement, la gouttière neurale se ferme, les crêtes neurales situées de part et d’autre se rapprochent sur la ligne médiane et fusionnent. La plaque neurale laisse place, dès la fin de la 4^{ème} semaine du

⁵Smith et Schoenwolf, 1997, Trends in Neurosciences

développement embryonnaire, à une nouvelle structure : le tube neural [6]. Dans sa partie antérieure, le tube neural donnera naissance au cerveau et dans sa partie postérieure, à la moelle épinière. Chez l'Homme, la séparation entre le cerveau et la moelle épinière est un événement se déroulant entre le 28^{ème} et le 30^{ème} jour embryonnaire. Au 32^{ème} jour, le tube neural se divise en trois vésicules primitives : le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale. Ces trois vésicules cérébrales abritent les organes des sens centraux (l'ouïe, l'odorat et la vue). L'évolution se poursuit, et l'organisation primitive en trois vésicules laisse place à une organisation plus complexe en cinq vésicules composées du télencéphale, du diencéphale, du mésencéphale, du métencéphale, et du myélocéphale (**Figure 1**). Le tube neural, dans sa partie rostrale au niveau du rhombencéphale, se segmente transitoirement sous la forme de renflements appelés rhombomères. Chaque rhombomère contient des unités de neurones distinctes et spécifiquement dédiées à l'innervation d'un organe cible avant même leur migration.

1.2. Histogenèse du tube neural

L'histogenèse du système nerveux comprend quatre grandes phases se chevauchant dans le temps : la prolifération, la différenciation, la migration cellulaire et la stabilisation.

Initialement, l'ectoderme d'où provient le tissu nerveux forme un épithélium unistratifié prismatique simple. Suite à la formation de la plaque neurale, les cellules de la paroi entrent en mitose et se transforment en épithélium prismatique pseudostratifié (avec un seul type de cellules neuro-épithéliales bipolaires et jointives). La plaque neurale se creuse ensuite pour former la gouttière neurale. Les replis de la gouttière neurale fusionnent, modelant le tube neural. Le tube neural, peu différencié, est constitué d'une couche de cellules souches neuro-épithéliales qui présentent une intense activité mitotique au cours de laquelle le noyau cellulaire exécute un déplacement caractéristique entre la surface basale et apicale, sa position évoluant en fonction des phases du cycle mitotique. Les cellules neuro-épithéliales poursuivent leurs divisions, permettant l'épaississement de la paroi du tube neural qui forme maintenant un épithélium pluristratifié. Cet épithélium va progressivement perdre son caractère épithélial.

⁶Pulikkunnel et Thomas, 2005, Journal of the Association of Physicians of India

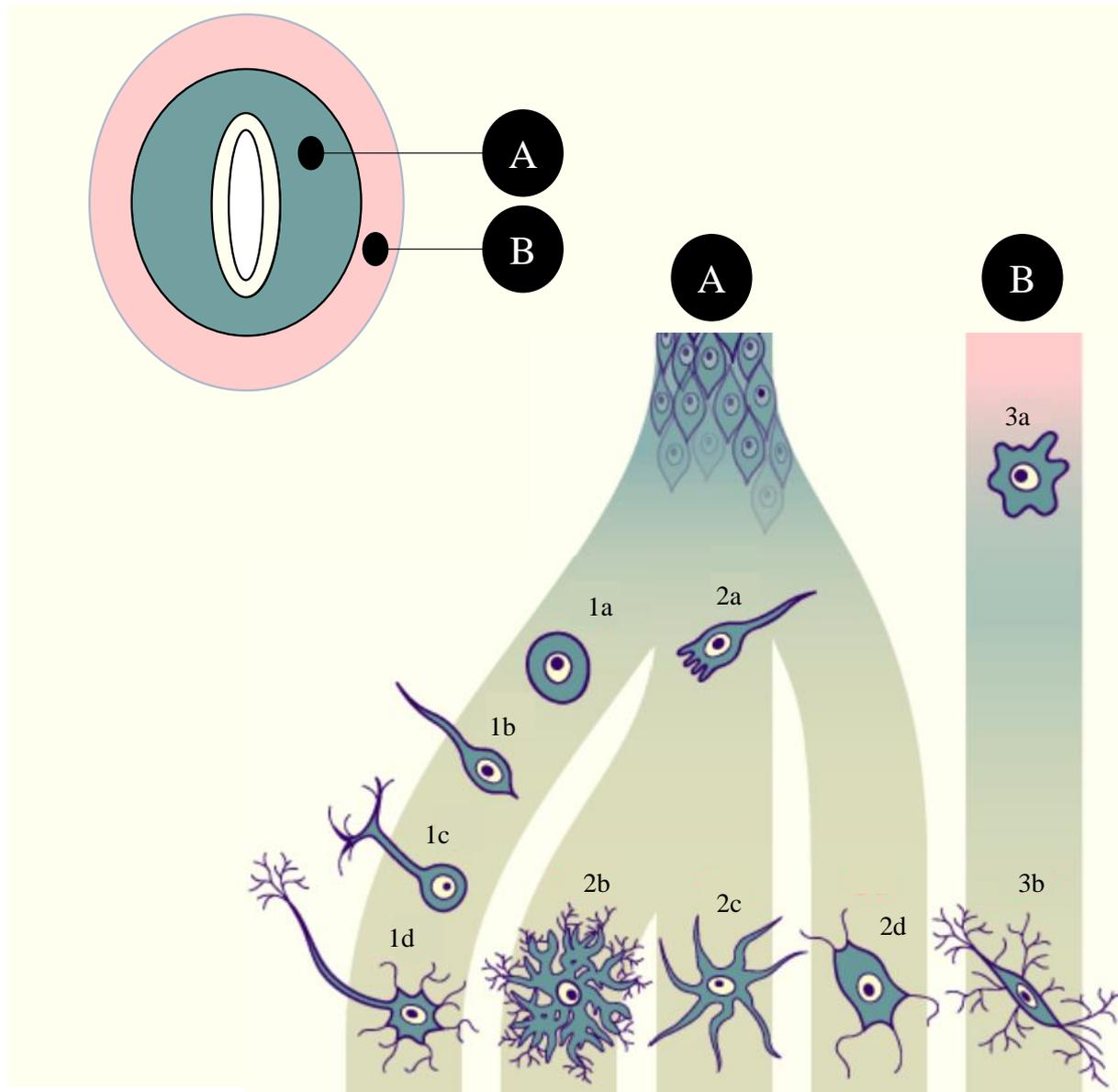


Figure 2 : Différenciation des différents types cellulaires cérébraux à partir des structures du tube neural. (A) Les neuroblastes et les glioblastes sont originaires de la zone du manteau. Suivant le nombre de prolongements, les neurones générés pourront être apolaires (1a), unipolaires (1b), bipolaires (1c) ou multipolaires (1d). Le glioblaste peut générer un astrocyte protoplasmique (2b), un astrocyte fibreux (2c) ou un oligodendrocyte (2d). Les astrocytes fibreux se distinguent des astrocytes protoplasmiques par leur richesse en gliofilaments. Les astrocytes fibreux se rencontrent plutôt dans la substance blanche et à la surface du système nerveux central, tandis que les astrocytes protoplasmiques sont plus fréquents dans la substance grise. Les astrocytes et les oligodendrocytes constituent la macroglie. **(B)** Les cellules de la microglie dérivent du mésoderme. Les cellules souches mésenchymateuses (3a) sont progénitrices de cellules microgliales (3b). Modifiée d'après www.embryology.ch [7]

⁷www.embryologie.ch

Parallèlement à la prolifération, la différenciation de la plupart des types cellulaires du futur système nerveux central débute dans le rhombencéphale dès la fin de la 4^{ème} semaine de gestation [8]. Les cellules souches neuro-épithéliales de la zone ventriculaire du tube neural qui ont développé une forte activité mitotique se différencient en neuroblastes, puis en glioblastes et enfin en épendymocytes. En se différenciant en neurones, les neuroblastes perdent définitivement leur capacité de division. Ces neurones post-mitotiques quittent, vers la 5^{ème} semaine, la zone ventriculaire et migrent pour former une nouvelle couche. Le télencéphale qui ne comportait alors que deux couches – la zone ventriculaire et la zone marginale – est maintenant constitué d’une troisième : la zone intermédiaire ou zone du manteau (**Figure 2**). A la fin de la période embryonnaire, les neuroblastes issus de la zone intermédiaire et de la zone ventriculaire vont constituer la plaque corticale. La zone ventriculaire, dont l’épaisseur se réduit, cesse progressivement sa production de neuroblastes, puis laissera place à l’épendyme vers la 10^{ème} semaine de gestation.

Peu après l’apparition des premiers neurones, les cellules neuro-épithéliales acquièrent des caractéristiques typiques de la lignée astrogliale. Cette lignée produit les cellules de la glie radiaire, et sont à la fois à l’origine des neurones et des cellules gliales.

Pendant de nombreuses années, les cellules de la glie radiaire ont uniquement été considérées comme un support utilisé par les neurones néoformés pour migrer le long des prolongements radiaux, de la région ventriculaire jusqu’à leur destination définitive dans le cortex [9]. Cette vision des cellules de la glie radiaire a toutefois été bousculée par des observations plus contemporaines qui montrent que ces cellules constituent également la source principale des neurones dans le système nerveux central [10, 11].

1.3. Développement du télencéphale et mise en place du cortex cérébral

Les hémisphères cérébraux sont issus de la partie antérieure du télencéphale dorsal. Ces deux hémisphères cérébraux sont peu à peu recouverts d’une couche de substance grise. Cette structure, extrêmement organisée, est appelée cortex cérébral (**Figure 3**).

⁸Florio et Huttner, 2014, Development

⁹Rakic, 1972, Journal of Comparative Neurology

¹⁰Götz *et al.*, 2002, Brain Research Bulletin

¹¹Anthony *et al.*, 2004, Neuron

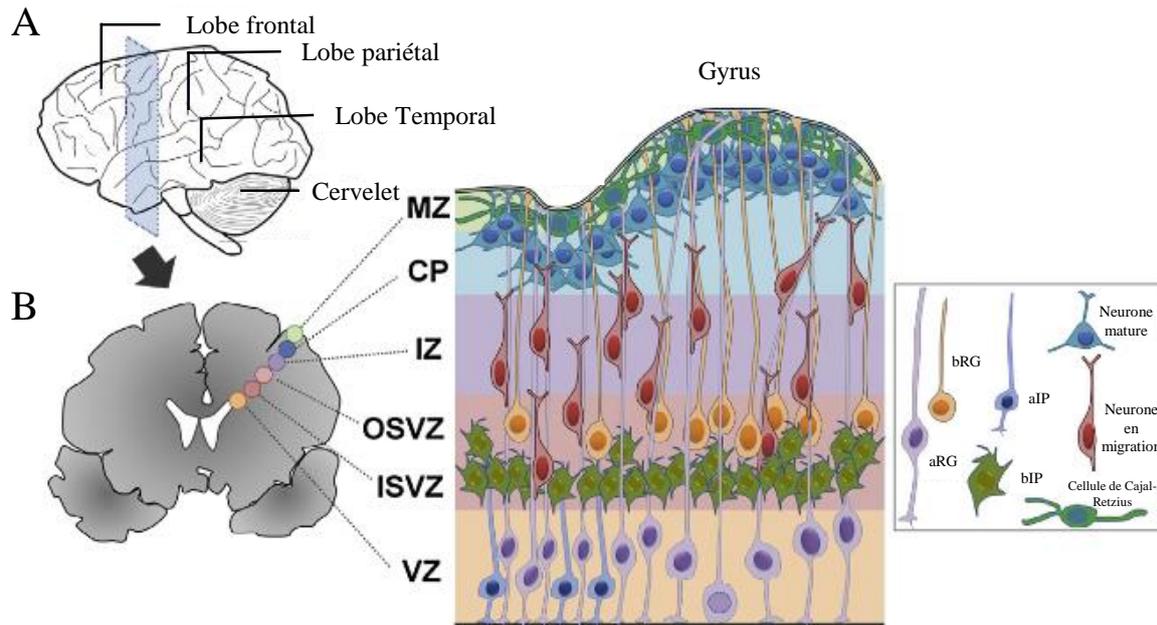


Figure 3 : Développement du cortex cérébral dans le cerveau humain. (A) Vue latérale d'un cerveau gyrencéphale adulte. (B) Vue en coupe d'un cerveau en développement. Les cercles représentent différentes régions du cortex cérébral immature. Les cellules souches neurales, également appelées cellules apicales de la glie radiaire (aRG), sont localisées dans la zone ventriculaire (VZ) et donnent naissance à la plupart des types cellulaires du cortex cérébral. Les aRG ont une morphologie très allongée avec deux prolongements cellulaires qui s'étendent de part et d'autre du cortex. Ces cellules peuvent se diviser symétriquement et assurent ainsi leur renouvellement. Elles peuvent aussi se diviser de façon asymétrique pour produire une autre cellule aRG et un progéniteur intermédiaire (IP). Le progéniteur intermédiaire va, à son tour, se diviser pour générer deux neurones. Ces neurones vont ensuite migrer vers la plaque corticale (CP) en suivant les prolongements des cellules aRG. Chez l'Homme, l'expansion du cortex est importante et résulte en partie de la présence d'un second type de cellules souches neurales, appelées les cellules basales de la glie radiaire (bRG). MZ : *Marginal zone*, IZ : *Intermediate zone*, OSVZ : *Outer subventricular zone*, ISVZ : *Inner subventricular zone*. Modifiée d'après Romero *et al.*, 2018 [12].

1.3.1. Mise en place des neurones au sein du cortex cérébral

Le développement du cortex cérébral est une entreprise complexe qui met en jeu la production d'une grande variété de neurones excitateurs et inhibiteurs. Les neurones qui constituent le cortex cérébral proviennent de deux régions : le *pallium* et le *subpallium*. Les neurones issus du *pallium* sont glutamatergiques et ont une migration radiale guidée par les cellules de la glie radiaire [13, 14].

¹²Romero *et al.*, 2018, *Seminars in Cell & Developmental Biology*

¹³Hatten et Mason, 1990, *Experientia*

¹⁴Rakic, 1990, *Experientia*

Le *subpallium* est responsable de la mise en place des éminences ganglionnaires, structures qui génèrent les interneurons GABAergiques dont le mode de migration tangentielle est vasculo-associé [15, 16].

La neurogenèse du cortex cérébral est, en premier lieu, marquée par la formation de la pré-plaque. Au cours de la neurogenèse, les cellules souches neuro-épithéliales subissent tout d'abord une division symétrique afin d'augmenter de manière exponentielle leur nombre et d'accroître la surface globale du télencéphale, puis ces cellules subissent une division asymétrique. Chaque division cellulaire produit alors une nouvelle cellule souche neuro-épithéliale se maintenant dans le neuroépithélium, et un neuroblaste post-mitotique destiné à se positionner dans la plaque corticale où il se différenciera [17, 18]. Il y rejoint une autre population de neurones : les cellules de Cajal-Retzius. Ces cellules sont générées en périphérie du télencéphale et migrent tangentiellement pour se positionner à la surface corticale [19]. Leur rôle est fondamental. En sécrétant une glycoprotéine, la *reelin*, les cellules de Cajal-Retzius régulent le positionnement des neurones dans l'épaisseur corticale [20]. La *reelin*, en diffusant dans le milieu extracellulaire, sert de signal d'arrêt à la migration des neurones pyramidaux issus de la zone ventriculaire par rupture de la liaison neurone/glie.

Plus tard, les neuroblastes traversent les couches profondes de la pré-plaque qui se trouve ainsi scindée en deux parties : une superficielle dite moléculaire qui formera la couche I du cortex et une profonde correspondant à la sous-plaque. Cette dernière tient un rôle essentiel dans la mise en place des projections thalamo-corticales. Les cellules neuronales qui traversent la sous-plaque profileront les couches II à VI [21].

Cette stratification du cortex est qualifiée d'*inside-out*, expression signifiant que les premiers neurones générés formeront les couches profondes alors que les plus jeunes constitueront les couches les plus superficielles [22, 23].

¹⁵Corbin *et al.*, **2001**, Nature Neuroscience

¹⁶Marin et Rubenstein., **2003**, Annual Review of Neuroscience

¹⁷Noctor *et al.*, **2004**, Nature Neuroscience

¹⁸Kosodo *et al.*, **2004**, Journal of the European Molecular Biology Organization

¹⁹Bielle *et al.*, **2005**, Nature Neuroscience

²⁰D'Arcangelo *et al.*, **1995**, Nature

²¹Heuer *et al.*, **2003**, Neuroscience

²²Angevine et Sidman, **1961**, Nature

²³McConnell, **1988**, Journal of Neuroscience

1.3.2. Mise en place des cellules gliales au sein du cortex cérébral

Le passage de la neurogenèse à la gliogenèse est le résultat de mécanismes moléculaires complexes induits par des signaux extrinsèques et intrinsèques. L'étroite relation existante entre la cellule de la glie radiaire et le neurone permet une mise en place harmonieuse du cortex cérébral.

La phase de gliogenèse a majoritairement lieu, chez l'Homme, au cours de la période périnatale et coïncide avec une expansion significative de la zone sous-ventriculaire [24]. La névroglie est composée de plusieurs types cellulaires : la macroglie, elle-même constituée des astrocytes et des oligodendrocytes, et la microglie.

Les astrocytes et les oligodendrocytes ont une origine neurectodermique, et sont issus comme les neurones, d'un précurseur neuro-épithélial. Après avoir servi de rail le long duquel les neurones générés se sont déplacés, les cellules de la glie radiaire deviennent, à la fin de la migration neuronale, des astrocytes par rupture de leurs attaches ventriculaire et piaie et par rétraction de leurs prolongements apical et basal [25]. Les astrocytes participent au maintien du réseau neuronal et ont une fonction nutritive vis-à-vis du neurone. Avec l'établissement de l'unité neuro-vasculaire, ces cellules participent également à la mise en place de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Comme pour les astrocytes, les oligodendrocytes proviennent des cellules souches neuro-épithéliales, qui ont dérivé en cellules précurseurs d'oligodendrocytes (OPC). Ces cellules émettent des prolongements cytoplasmiques qui enveloppent les axones autour desquels ils forment une gaine protectrice : la gaine de myéline. La myélinisation des axones, qui se poursuit après la naissance durant la première année de vie, permet une conduction saltatoire des signaux électriques.

La microglie, présente chez l'Homme dès la 3^{ème} semaine de gestation, dérive du mésoderme et possède une origine hématopoïétique. Les cellules de la microglie sont particulières dans la mesure où elles sont capables de changer rapidement de morphologie. En réponse à une agression, les cellules de la microglie passent d'un état de repos à un état dit activé. A l'état de repos, les prolongements de la microglie entrent en contact avec les neurones avoisinants, protégeant ainsi l'intégrité neuronale. La microglie est alors qualifiée de ramifiée. A l'état activé, les prolongements se rétractent jusqu'à disparaître et le corps cellulaire s'agrandit jusqu'à former une hypertrophie cytoplasmique. La microglie est, dans ce contexte, classée

²⁴Buono *et al.*, **2015**, Journal of Neuroscience

²⁵Cameron et Rakic, **1991**, Glia

d'amiboïde. Au cours du développement fœtal, la microglie est amiboïde et participe à l'élimination de populations neuronales spécifiques et au processus de synaptogenèse. Par la suite et dans le cerveau adulte, la microglie acquiert une morphologie ramifiée.

1.4. Développement de la vascularisation cérébrale

1.4.1. Mise en place de la circulation cérébrale

Chez l'Homme, lors des premières étapes du développement embryonnaire, le réseau vasculaire est absent. Les nutriments et l'oxygène indispensables à la croissance cellulaire se font par diffusion simple [26]. Puis, vers le 18^{ème} jour embryonnaire, un réseau de vaisseaux sanguins se met rapidement en place par le biais de deux processus : la vasculogenèse et l'angiogenèse (**Figure 4**). La vasculogenèse consiste en une formation embryonnaire des premiers vaisseaux sanguins. Ce processus se caractérise par la différenciation, à partir du mésoderme, des hémangioblastes en angioblastes puis en cellules endothéliales, et par la constitution d'un plexus vasculaire primaire [27]. L'angiogenèse, quant à elle, se définit comme la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Elle est nécessaire à la maturation du plexus vasculaire en permettant son expansion et son remodelage [27]. Ce second processus constitue, aussi bien chez l'embryon que chez l'adulte, le principal mécanisme de la vascularisation des tissus en développement.

La circulation de l'extrémité céphalique de l'embryon s'esquisse précocement, autour du 28^{ème} jour embryonnaire. Tandis que les vésicules céphaliques s'individualisent de la moelle épinière, le prosencéphale reçoit des branches de l'artère carotide interne. Le rhombencéphale et le mésencéphale sont eux irrigués par les branches de l'artère vertébrale. En se rejoignant, l'artère carotide interne et l'artère vertébrale forme une structure de suppléance : le polygone de Willis. Cette structure, définitivement constituée vers la 8^{ème} semaine de gestation [28, 29], permet au cerveau adulte de continuer à être irrigué, même en cas de lésion ou d'obstruction artérielle [30].

²⁶Noden, **1989**, The American Review of Respiratory Disease

²⁷Risau, **1997**, Nature

²⁸Padget, **1948**, Intracranial Arterial Aneurysms

²⁹Van Overbeeke *et al.*, **1991**, Journal of Anatomy

³⁰Van der Grond *et al.*, **2004**, Neurology

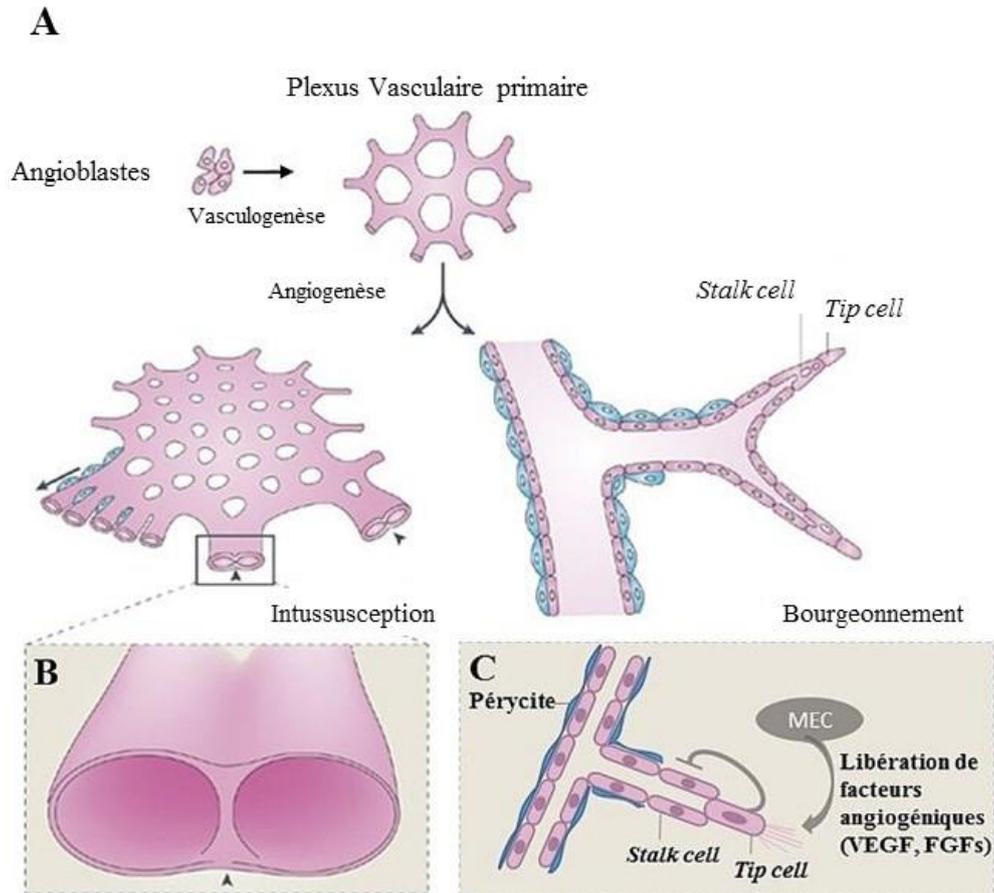


Figure 4 : La vasculogénèse et les deux types d’angiogénèse. (A) La vasculogénèse correspond à la différenciation des cellules endothéliales à partir des angioblastes, permettant la formation d’un plexus vasculaire primaire. (B) Ce dernier se remodèle et croît grâce aux processus d’angiogénèse. L’angiogénèse par intussusception se caractérise par l’élargissement et la séparation des vaisseaux déjà formés. (C) L’angiogénèse par bourgeonnement implique des cellules endothéliales spécialisées, les *tip cells*. Il s’agit de cellules endothéliales riches en filopodes et situées à l’extrémité d’un cône de croissance endothélial et dont le rôle est de guider les vaisseaux en formation. Ces *tip cells*, grâce à leurs filopodes, perçoivent leur environnement et orientent le processus de bourgeonnement. Elles sont suivies des *stalk cells* qui vont stabiliser le vaisseau en élongation. Au cours de l’élongation, les *tip cells* induisent le phénotype « *stalk cell* » contrôlant ainsi le nombre de *tip cells*. D’après Dijke et Arthur, 2007 [31].

1.4.2. Mécanismes cellulaires de l’angiogénèse

Le système nerveux central est vascularisé par la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Ce processus, appelé angiogénèse, s’effectue soit par bourgeonnement, soit par intussusception ([32, 33]; **Figure 4**). Dans le cerveau,

³¹Dijke et Arthur, 2007, Nature Reviews. Molecular Cell Biology

³²Carmeliet, 2000, Nature Medicine

³³Burri *et al.*, 2004, Developmental Dynamics

l'intussusception n'est que très peu représentée. En revanche, l'angiogenèse par bourgeonnement étant plus prédominante, elle sera ici plus précisément abordée.

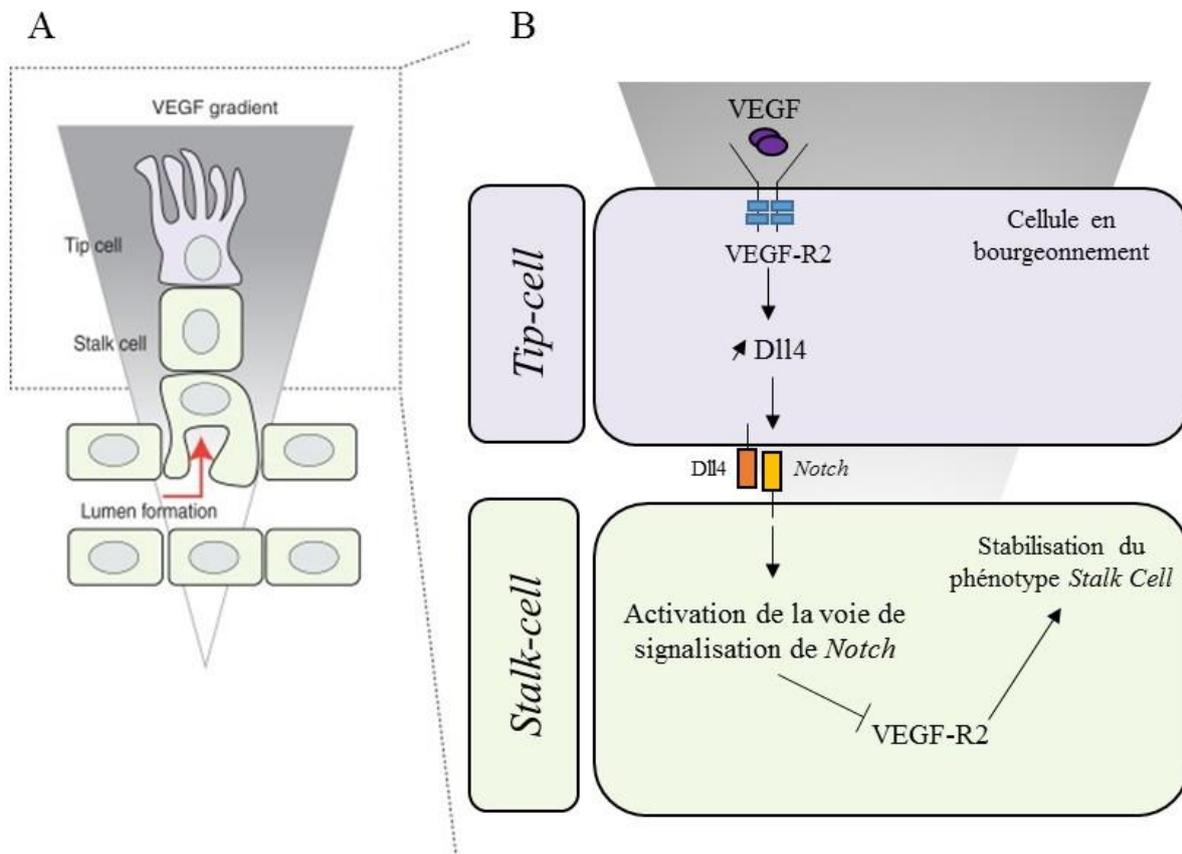


Figure 5 : Caractérisation phénotypique de la cellule endothéliale lors du processus d'angiogenèse. (A) Illustration des types cellulaires impliqués dans l'angiogenèse par bourgeonnement. Au cours de l'angiogenèse par bourgeonnement, la caractérisation phénotypique de la cellule endothéliale au sein de l'endothélium vasculaire est déterminée par des voies de signalisation impliquant un gradient de VEGF. (B) Ce gradient de VEGF permet la sélection d'une *tip-cell*. Le VEGF se fixe sur VEGF-R2, exprimé par la *tip-cell*. A travers cette fixation, la *tip-cell* va surexprimer Dll4, un ligand de *Notch*. A son tour, Dll4, en interagissant avec *Notch* exprimé par la *stalk-cell*, va activer la voie de signalisation associée à ce dernier entraînant une réduction de l'expression de VEGF-R2 au sein de cette cellule et menant à l'expression de gènes responsables du maintien de son phénotype. Modifiée d'après Blanco et Gerhardt, 2013 [34].

Alors que dans les années 1980, l'angiogenèse n'était réduite qu'à la prolifération de cellules endothéliales, il est aujourd'hui connu que la constitution d'un nouveau capillaire sanguin à partir d'un vaisseau préexistant nécessite deux étapes : une phase d'activation et une phase de maturation. Au cours de la phase d'activation, des facteurs angiogéniques se lient à leurs récepteurs présents à la surface des cellules endothéliales et induisent la sécrétion de

³⁴Blanco et Gerhardt, 2013, Cold Spring Harbor perspective in medicine

métalloprotéinases responsables de la dégradation de la membrane basale du vaisseau et de la matrice extracellulaire. Cette dégradation va permettre la migration et la prolifération des cellules endothéliales [35]. Dans le milieu matriciel dégradé, une cellule endothéliale s'engage vers un phénotype « *tip-cell* ». Il s'agit d'une cellule endothéliale riche en filopodes. Située à l'extrémité d'un cône de croissance endothéliale, la *tip-cell* perçoit son environnement grâce à ses filopodes et guide les vaisseaux en formation. Les cellules au contact de la *tip-cell* adoptent un phénotype différent, appelé « *stalk-cell* ». Ces cellules jointives et alignées derrière la *tip-cell* permettent l'allongement progressif du bourgeon vasculaire *via* des divisions mitotiques [36]. La caractérisation phénotypique de la cellule est contrôlée par les facteurs de croissance et les récepteurs appartenant à la famille du *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) et par le système *Delta-like protein 4* (Dll4)/*Notch* [37]. La fixation du VEGF sur son récepteur, le *Vascular Endothelial Growth Factor-Receptor 2* (VEGF-R2) exprimé par la *tip-cell*, conduit cette dernière à surexprimer Dll4, un ligand de *Notch*. La liaison de Dll4 sur son récepteur *Notch* à la surface de la *stalk-cell* réprime l'expression de VEGF-R2 par cette cellule, incitant la stabilisation des vaisseaux formés [38]. Le système Dll4/*Notch* agit donc comme un régulateur de la ramification vasculaire (**Figure 5**). L'angiogenèse se poursuit ensuite par la phase de maturation. Lorsque les deux bourgeons vasculaires se sont rejoints pour former le vaisseau, des jonctions s'établissent entre les cellules. Des cellules musculaires lisses et des péricytes sont recrutés dans le but de reconstituer une membrane basale autour des nouveaux vaisseaux sanguins [39].

Contrairement à l'angiogenèse par bourgeonnement, l'angiogenèse par intussusception ne nécessite pas l'activation des cellules endothéliales. Le processus est initié par l'invagination de l'endothélium dans la lumière du vaisseau sanguin, suivie de la formation d'une séparation entre les cellules endothéliales puis d'une colonisation de l'espace intercellulaire par les fibroblastes et les péricytes qui synthétisent de la matrice extracellulaire pour stabiliser le vaisseau [40].

³⁵Folkman, 2003, Current Molecular Medicine

³⁶Siemerink *et al.*, 2013, Journal of Histochemistry & Cytochemistry

³⁷Jakobsson *et al.*, 2010, Nature Cell Biology

³⁸Blanco et Gerhardt, 2013, Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine

³⁹Carmeliet et Jain, 2011, Nature

⁴⁰Djonov *et al.*, 2003, Cell and Tissue Research

1.5. Interactions entre systèmes vasculaire et cérébral

L'existence d'une congruence neurovasculaire est un concept répandu, des études ont notamment montré que l'organisation des nerfs sensitifs périphériques déterminait le profil de différenciation et de ramification des vaisseaux sanguins [41, 42]. Deux modèles aboutissant à la congruence neurovasculaire ont été proposés. Le modèle « *one-patterns-the-other* » est un modèle dans lequel chacun des deux systèmes possède son propre répertoire de signaux attractifs et répulsifs. L'un des deux systèmes (nerveux ou vasculaire) orchestre la mise en place de l'autre, les nerfs et les vaisseaux sanguins suivent alors des trajets parallèles, indépendamment de leur position vis-à-vis du milieu environnant [43]. Le modèle « *independant patterning* » est un modèle dans lequel la mise en place des deux systèmes est conditionnée par des signaux attractifs et répulsifs provenant d'un répertoire commun. Au cours du neurodéveloppement, les processus d'angiogenèse cérébrale et de neurogenèse sont concomitants et interagissent entre eux [44, 45]. Il existe plusieurs exemples d'interactions neurovasculaires au cours du développement cérébral. Ainsi, les données d'une étude menée chez la souris montrent l'existence d'une relation étroite entre les cellules endothéliales et les interneurons GABAergiques en migration [46]. En effet, la délétion conditionnelle du VEGF exprimé par les cellules endothéliales résulte en une perturbation de l'intégration des interneurons au sein des différentes couches corticales. De plus, une absence de VEGF endothélial serait susceptible d'entraîner la survenue chez l'enfant de troubles tels que l'épilepsie, le retard mental ou encore la dyslexie développementale [46]. Par ailleurs, durant leur phase de migration tangentielle, les progéniteurs GABAergiques vont se servir du réseau vasculaire pour migrer. En effet, les cellules endothéliales du réseau vasculaire cérébral sécrètent du GABA. En se fixant sur les récepteurs GABA_A et GABA_B exprimés par les précurseurs GABAergiques en migration, le GABA va agir comme un signal de guidage de la migration des interneurons GABAergiques ([47] ; **Figure 6**). Les cellules endothéliales se retrouvent ainsi doter d'un rôle de support à la migration neuronale.

⁴¹Mukouyama *et al.*, 2002, Cell

⁴²Mukouyama *et al.*, 2005 Development

⁴³Andreone *et al.*, 2015, The Annual Review of Neuroscience

⁴⁴Carmeliet et Tessier-Lavigne, 2005, Nature

⁴⁵Celin *et al.*, 2015, PLoS One

⁴⁶Li *et al.*, 2013, Journal of Neuroscience

⁴⁷Cuzon *et al.*, 2016, Cerebral Cortex

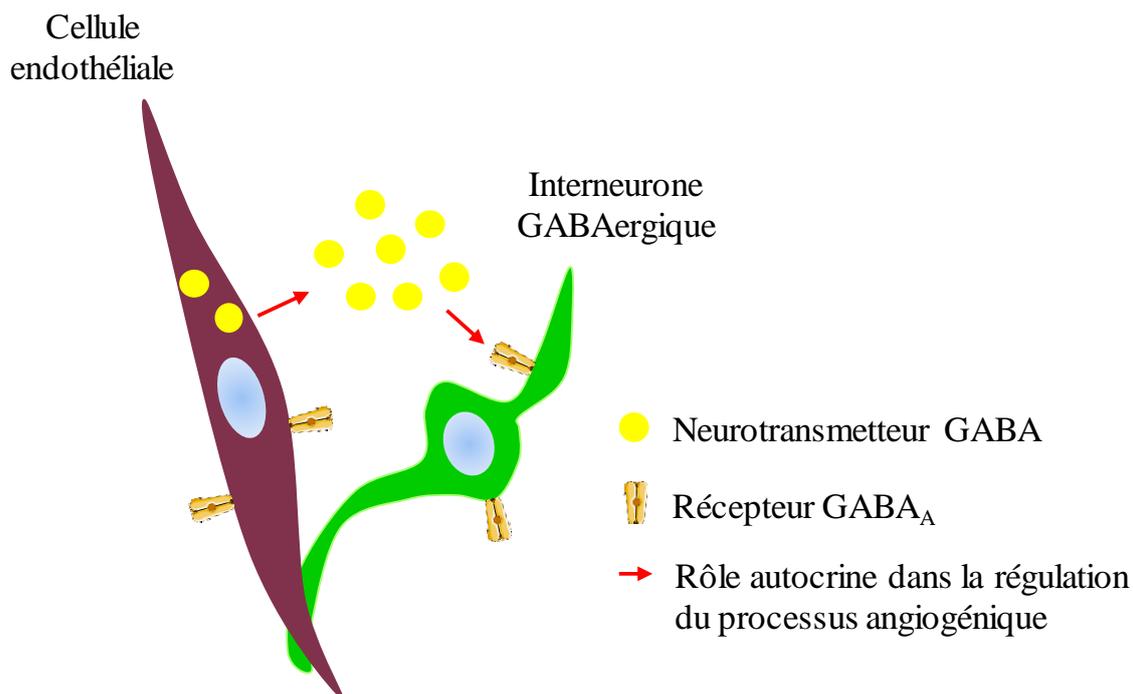


Figure 6 : Les cellules endothéliales, rôle de support à la migration neuronale. Le GABA sécrété par les cellules endothéliales se fixe sur les récepteurs GABA_A exprimés par les interneurones en migration. Les cellules endothéliales seraient donc dotées d'un rôle de support à la migration des neurones. Modifiée d'après Won *et al.*, 2013 [48].

La migration des oligodendrocytes constitue un second exemple d'interaction neurovasculaire. Que ce soit dans le cerveau humain ou murin, les oligodendrocytes sont issus de la zone ventriculaire du neuroépithélium du tube neural. Ces cellules migrent uniformément sur de grandes distances à travers le système nerveux pour atteindre leurs zones cibles où sera complétée leur maturation [49]. Cependant, le moyen utilisé par les OPCs pour migrer n'était pas clairement établi. Une étude de 2016 a, en partie, permis de lever le voile sur le mécanisme de migration en montrant qu'il existait dans le cerveau embryonnaire chez la souris une interaction entre les OPCs et le réseau vasculaire. Notamment, les cellules endothéliales créent une niche favorable à la migration des OPCs et à leur maturation ([50, 51] ; **Figure 7**).

⁴⁸Won *et al.*, 2013, Nature Communication

⁴⁹Kessaris *et al.*, 2006, Nature Neuroscience

⁵⁰Tsai *et al.*, 2016, Science

⁵¹Dejana et Betsholtz, 2016, Science

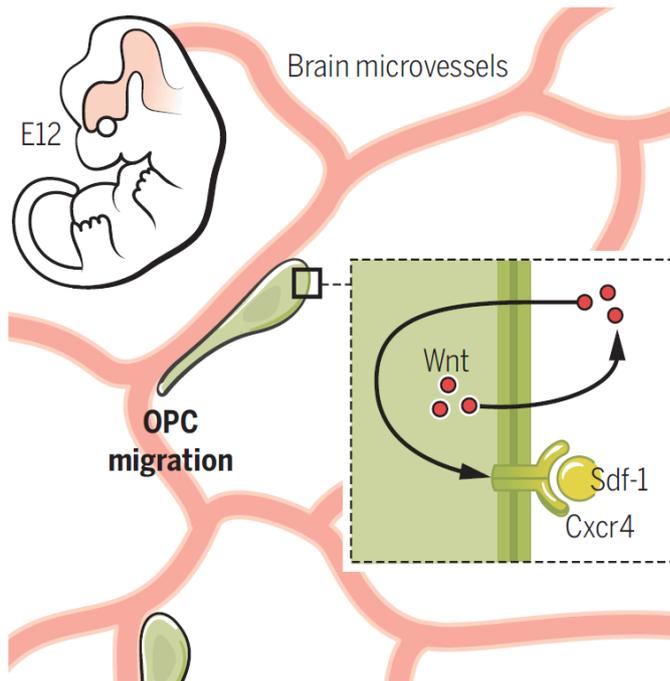


Figure 7 : Mécanisme dirigeant la migration des OPCs le long des microvaisseaux au cours du développement cérébral. Au niveau des oligodendrocytes, la voie de signalisation Wnt canonique va induire une augmentation de l'expression de la chémokine Cxcr4. Au niveau des cellules endothéliales, une autre chémokine est produite : sdf-1, ligand de Cxcr4. La migration des OPCs va être déclenchée par l'interaction de sdf-1 avec Cxcr4. Cxcr4 : *chemokine (C-X-C motif) receptor 4* ; sdf1 : *stromal-derived factor 1*. Modifiée d'après Dejana et Betsholtz, 2016 [51].

Dans le cerveau adulte, Snapyan et collaborateurs ont montré que l'organisation structurale des vaisseaux sanguins et les signaux moléculaires qu'ils expriment sont importants pour la migration des neuroblastes issus de la zone sous-ventriculaire [52]. En effet, les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins synthétisent du *Brain-Derived Neurotrophic factor* (BDNF) qui, une fois libéré dans le milieu extracellulaire, contribue au guidage des neurones vers les bulbes olfactifs ([52] ; **Figure 8**).

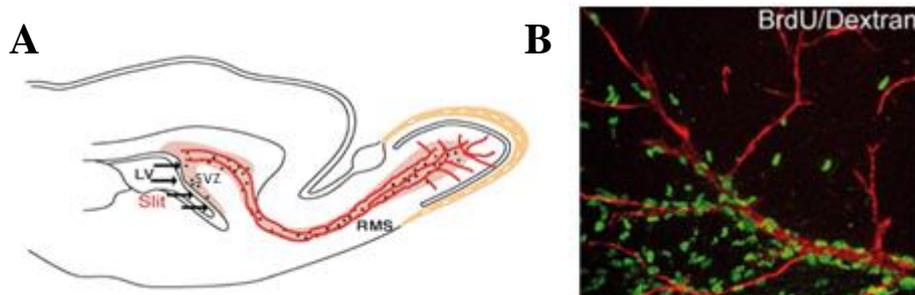


Figure 8 : Illustration de la voie de migration rostrale chez la souris adulte. (A) Les neuroblastes générés au niveau de la zone sub-ventriculaire (SVZ) sont orientés vers la voie de migration rostrale par l'action de facteurs chemorépulsifs tels que *Slit*. L'orientation des vaisseaux sanguins, parallèle à ce courant migratoire, permet ensuite aux neuroblastes de migrer jusqu'aux bulbes olfactifs. (B) Visualisation de neuroblastes en migration en interaction étroite avec les vaisseaux sanguins. Les neuroblastes ont été marqués à la bromodésoxyuridine (BrdU) et les vaisseaux au dextran-TRITC. LV : ventricule latéral ; RMS : *rostral migratory stream*. D'après Snapyan *et al.*, 2009 [52].

⁵²Snapyan *et al.*, 2009, Journal of Neuroscience

2. La famille du VEGF/PlGF : des acteurs de l'angiogenèse

L'angiogenèse se définit comme l'ensemble des processus cellulaires et moléculaires conduisant à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir du réseau vasculaire préexistant. Elle se distingue de la vasculogenèse qui consiste en la formation embryonnaire de premiers vaisseaux sanguins et lymphatiques. L'analyse des mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle de l'angiogenèse a permis l'identification de nombreuses familles de protéines, telles que des molécules d'adhérence, ou des enzymes protéolytiques (**Table 1**). Parmi ces acteurs, la famille du VEGF constitue l'une des plus importantes.

Activateurs	Fonction	Inhibiteurs	Fonction
Membre de la famille du VEGF	Stimule l'angio/vasculogenèse, la perméabilité, l'adhésion des leucocytes	VEGF-R1 membranaire et soluble, NRP-1 soluble	Antagoniste
VEGFR, NRP-1	Intégration des signaux angiogénique et de survie	Ang2	Antagoniste de Ang1
Ang1 et Tie2	Stabilisation des vaisseaux, inhibition de la perméabilité	TSP-1, -2	Inhibition de la migration endothéliale, de la croissance, de l'adhésion et de la survie
PDGF-BB et récepteurs	Recrutement des cellules musculaires lisses	Angiostatine	Suppression de l'angiogenèse tumorale
TGF-β1, récepteurs TGF-β	Stimulation de la production de matrice extracellulaire	Endostatine	Inhibition de la survie et de la migration endothéliale
FGF, HGF, MCP-1	Stimulation angio/arteriogenèse	Vasostatine, calréticuline	Inhibition de la croissance endothéliale
Intégrines $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$	Récepteurs des macromoléculaires de la matrice et des protéinases	TIMPs, Inhibiteurs de MMP	Suppression de l'angiogenèse pathologique
VE-cadherin, PECAM	Molécules de jonctions endothéliales	IFN-α, -β, -γ, IP-10, IL-4, IL-12, IL-18	Inhibition de la migration endothéliale
PAI-1	Stabilisation des vaisseaux naissants	Prolactine	Inhibition bFGF/VEGF
MMPs, activateur tissulaire du plasminogène	Remodelage de la matrice, libération et activation des facteurs de croissance	VEGI	Modulation de la croissance cellulaire
NOS, COX-2	Stimulation de l'angiogenèse et vasodilatation	Platelet factor-4	Inhibition de la liaison de bFGF et de VEGF

Table 1 : Activateurs et inhibiteurs de l'angiogenèse. VEGF-R : *vascular endothelial growth factor receptor* ; NRP : *Neuropilin* ; MMP : *matrix metalloproteinase* ; TIMPs : *tissue inhibitors of MMP* ; IP-10 : *inducible protein-10* ; TNF : *tumor-necrosis factor* ; Ang : *angiopoietin* ; PDGF : *platelet-derived growth factor* ; TGF : *transforming growth factor* ; FGF : *fibroblast growth factor* ; HGF : *hepatocyte growth factor* ; MCP : *monocyte chemoattractant protein* ; VE-cadherin : *vascular endothelial cadherin* ; PECAM : *platelet endothelial cell adhesion molecule* ; PAI : *plasminogen activator inhibitor* ; NOS : *nitric oxide synthase* ; COX : *cyclooxygenase* ; TSP : *thrombospondin* ; IFN : *interferon* ; IP : *interferon gamma-induced protein* ; IL : *interleukin* ; bFGF : *basic fibroblast growth factor* ; VEGI : *vascular endothelial growth inhibitor*. D'après Carmeliet et Jain, 2000 [53].

⁵³Carmeliet et Jain, 2000, Nature

2.1. La famille du VEGF

La famille du VEGF appartient à une sous-famille de facteurs de croissance, la famille du PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) qui comporte sept membres : VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F et le PlGF. Mis à part le VEGF-E et le VEGF-F qui sont respectivement d'origine virale et reptilienne, tous sont codés dans le génome des mammifères et possèdent des rôles distincts [54].

2.1.1. Le VEGF-A

L'histoire du VEGF s'écrit dans les années 1980 grâce à la convergence de plusieurs études. En 1983, Donald Senger et Harold Dvorak ont mis en évidence un composé capable d'induire une forte perméabilité vasculaire [55]. Le nom de VPF pour *Vascular Permeability Factor* lui a alors été donné. L'histoire de ce composé se précise en 1989 lorsque Napoleone Ferrara et Jean Plouët identifient et isolent à partir des surnageants de culture de cellules endothéliales et de cellules folliculaires issues d'hypophyses bovines, un facteur ayant une activité mitogène. Ce facteur fut baptisé VEGF pour *Vascular Endothelial Growth Factor* [56, 57]. En cette même année 1989, Ferrara compléta ses avancées en publiant son travail dans lequel préfigure la complexité moléculaire de la famille des VEGFs avec l'identification, par le clonage, de plusieurs variants d'épissage codants des isoformes de poids moléculaires différents (**Figure 9**). Plus tard, il a été admis que le VPF et le VEGF correspondaient en réalité à un même et unique facteur de croissance, que l'on connaît aujourd'hui sous le nom de VEGF.

Le gène du VEGF-A humain, localisé sur le bras court du chromosome 6, est organisé en 8 exons séparés par 7 introns. La première isoforme (VEGF₁₆₅) a été identifiée en 1989 par Napoleone Ferrara [56]. Depuis cette date et jusqu'à 2003, six autres isoformes ont été découvertes : VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₂, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉, et VEGF₂₀₆ ([58] ; **Figure 9**). Les isoformes 121, 165, 183, 189, et 206 sont issus d'un épissage alternatif alors que les isoformes 145 et 162 sont obtenus par clivage enzymatique. Chez la Souris, le gène du VEGF-A est localisé sur le chromosome 17 et des isoformes équivalentes aux isoformes humaines sont retrouvées chez cette espèce.

⁵⁴Shibuya, 2008, BMB Reports

⁵⁵Senger *et al.*, 1983, Science

⁵⁶Ferrara et Henzel, 1989, Biochemical and Biophysical Research Communication

⁵⁷Plouët *et al.*, 1989, Journal of the European Molecular Biology Organization

⁵⁸Harper et Bates, 2008, Nature Reviews Cancer

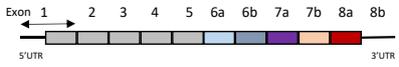
Isoforme	Représentation	Ancrage à la membrane	Distribution tissulaire
VEGF ₂₀₆		Oui	Limitée au placenta
VEGF ₁₈₉		Oui	Tous types cellulaires
VEGF ₁₈₃		Oui	Tous types cellulaires
VEGF _{162/165}		Oui, mais également sécrétée	Tous types cellulaires
VEGF ₁₄₅		Oui	Limitée au placenta
VEGF ₁₂₁		Non, forme totalement sécrétée	Tous types cellulaires

Figure 9 : Isoformes du VEGF. Les isoformes du VEGF proviennent d'un épissage alternatif des exons 6 et 7. La présence ou l'absence de ces exons leur confèrent différentes caractéristiques et biodisponibilités. Modifiée d'après Harper et Bates, 2008 [58].

Deux études indépendantes ont décrit l'importance du rôle joué par le VEGF-A dans la vasculogenèse embryonnaire et l'angiogenèse. A titre d'exemple, l'inactivation du gène codant le VEGF-A est létale au stade embryonnaire (entre le 11^{ème} et le 12^{ème} jour), et ceci même à l'état hétérozygote [59]. Les embryons hétérozygotes présentent des anomalies du développement, associées à des défauts de vascularisation, notamment au niveau du placenta et du système nerveux.

2.1.2. Les VEGF-B, -C, -D, -E et -F

Le VEGF-B exerce une activité angiogénique au cours de la vasculogenèse et de l'angiogenèse embryonnaires. Il présente une distribution tissulaire large et est particulièrement abondant dans les muscles cardiaques et squelettiques [54].

⁵⁹Carmeliet *et al.*, 1996, Nature

Le VEGF-C et le VEGF-D, synthétisés sous une forme immature, subissent une maturation protéolytique qui génère des formes plus courtes impliquées dans la régulation de la lymphogenèse [60].

Exprimé très tôt dans le développement embryonnaire, le gène du VEGF-C joue un rôle crucial dans la mise en place du réseau lymphatique. Chez l'adulte, le VEGF-C participerait à la maintenance de ce réseau. Quant au VEGF-D, son rôle est moins connu. Toutefois, son patron d'expression chez la Souris révèle un rôle important dans le développement pulmonaire. Le VEGF-C et le VEGF-D sont également retrouvés au niveau du cœur, du foie, des cellules mésenchymateuses [54].

Le VEGF-E a été identifié dans le génome des parapoxvirus et plus précisément dans celui du virus de l'Orf. Ce facteur est indispensable à la croissance du virus et stimule la prolifération des vaisseaux sanguins au niveau du site d'infection.

Le VEGF-F, aussi désigné par svVEGF (*snake venom Vascular Endothelial Growth Factor*), regroupe un ensemble de molécules isolées à partir du venin de quelques serpents. Il augmente la perméabilité vasculaire et entraînent la diffusion rapide des molécules toxiques vers les tissus cibles [61, 54].

2.1.3. Le PlGF

Le PlGF compte 42% d'homologie dans sa composition en acides aminés avec le VEGF-A. Le gène du PlGF humain, situé sur le bras long du chromosome 14, contient 7 exons [62]. Quatre isoformes humaines du PlGF ont été rapportées : PlGF₁₃₁, PlGF₁₅₂, PlGF₂₀₃, PlGF₂₂₄ (**Figure 10**). Ces isoformes, obtenues par épissage alternatif de l'ARN, diffèrent en termes de taille et d'affinité de liaison.

En dehors du placenta, le PlGF est faiblement exprimé dans la plupart des tissus sains. Toutefois, son expression se trouve augmentée en conditions pathologiques dans plusieurs types cellulaires à l'instar des cellules endothéliales, des fibroblastes, des précurseurs médullaires, des leucocytes, des cellules neuronales, des cardiomyocytes et des cellules tumorales [63].

⁶⁰McColl *et al.*, 2007, The Federation of America Societies for Experimental Biology Journal

⁶¹Pages et Pouyssegur, 2005, Cardiovascular Research

⁶²De Falco, 2012, Experimental & Molecular Medicine

⁶³Fisher *et al.*, 2008, Nature Reviews Cancer

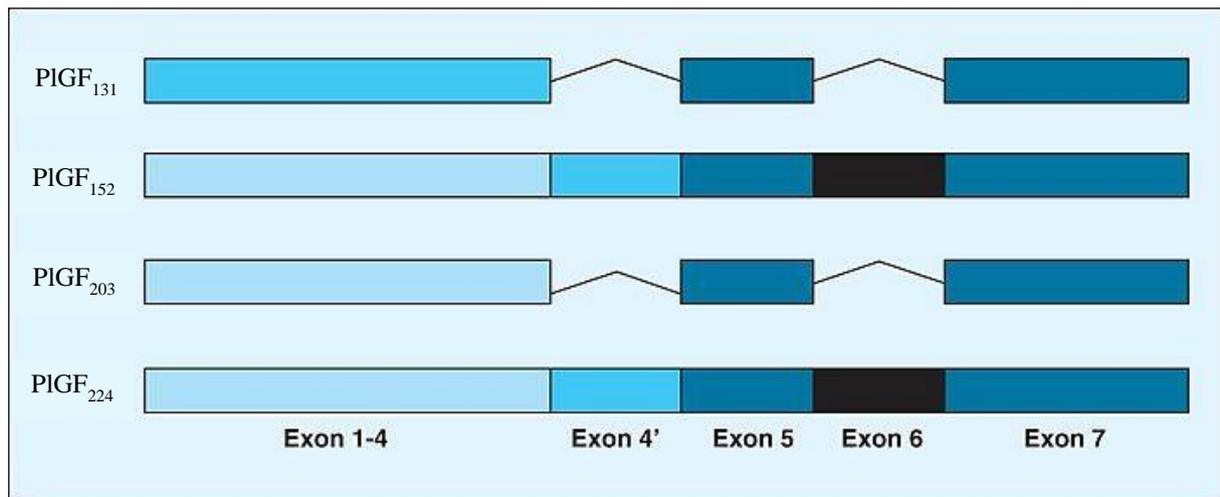


Figure 10 : Isoformes du PIGF. Les isoformes du PIGF proviennent d'un épissage alternatif. Modifiée d'après Lecarpentier *et al.*, 2016 [64].

Contrairement au VEGF-A, l'inactivation du gène codant le PIGF chez la Souris n'est pas létale [65]. De plus, il a longtemps été considéré que le PIGF n'exerçait par une action essentielle sur le développement embryonnaire [65]. De manière plus récente, il a été montré qu'une déficience en PIGF chez la Souris était associée à une altération du développement vasculaire cérébral [66], et qu'une répression spécifique du PIGF au niveau du placenta était responsable d'une perturbation de l'angiogenèse corticale cérébrale fœtale [67].

2.2. Les récepteurs du VEGF et du PIGF

2.2.1. Les VEGF-R1, -R2 et -R3 : généralités

Les membres de la famille du VEGF exercent leur action en se liant à trois récepteurs tyrosine kinase spécifiques : le VEGF-R1 (ou Flt-1 ; *fms related tyrosine kinase 1*), le VEGF-R2 (ou Flk-1 ; *fetal liver kinase 1*) et le VEGF-R3 (ou Flt-4 ; *fms related tyrosine kinase 4* ; **Figure 11**).

Ces récepteurs ont des analogies de séquences et de structures. La partie extracellulaire comporte sept domaines IgG-like qui interviennent dans les processus de dimérisation [68]. En plus de la partie extracellulaire, ces trois récepteurs contiennent également un domaine transmembranaire ainsi qu'une partie intracellulaire composée de deux domaines à activité

⁶⁴Lecarpentier et Tsatsaris, 2016, Annales d'Endocrinologie

⁶⁵Freitas-Andrade *et al.*, 2011, Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism

⁶⁶Luna *et al.*, 2016, Molecular Human Reproduction

⁶⁷Lecuyer *et al.*, 2017, Acta Neuropathological Communications

⁶⁸Grünewald *et al.*, 2010, Biochimica Biophysica Acta

tyrosine kinase [69]. Selon leur distribution tissulaire et leurs ligands, le rôle de chacun de ces récepteurs diffère [70, 71]. Notons que le VEGF-R1 lie le VEGF-A, le VEGF-B et le PlGF avec une forte affinité ; le VEGF-R2 est capable de reconnaître le VEGF-A, le VEGF-C, le VEGF-D et le VEGF-E ; enfin, le VEGF-R3 lie préférentiellement les VEGF-C et VEGF-D [72]. L'activation de ces récepteurs par la fixation de leurs ligands respectifs, stimule après dimérisation, de multiples voies de signalisation intracellulaire [73, 74]. En particulier, il a été mis en évidence une activation de la protéine kinase C (PKC ; [73]), de la MAP kinase p38 [75] et de la voie Akt/PKB [76]. L'activation de ces voies de signalisation par le VEGF *via* le VEGF-R2 est impliquée dans la régulation de la prolifération (PKC), de la migration (p38) et de la survie cellulaire (Akt/PKB ; [77]).

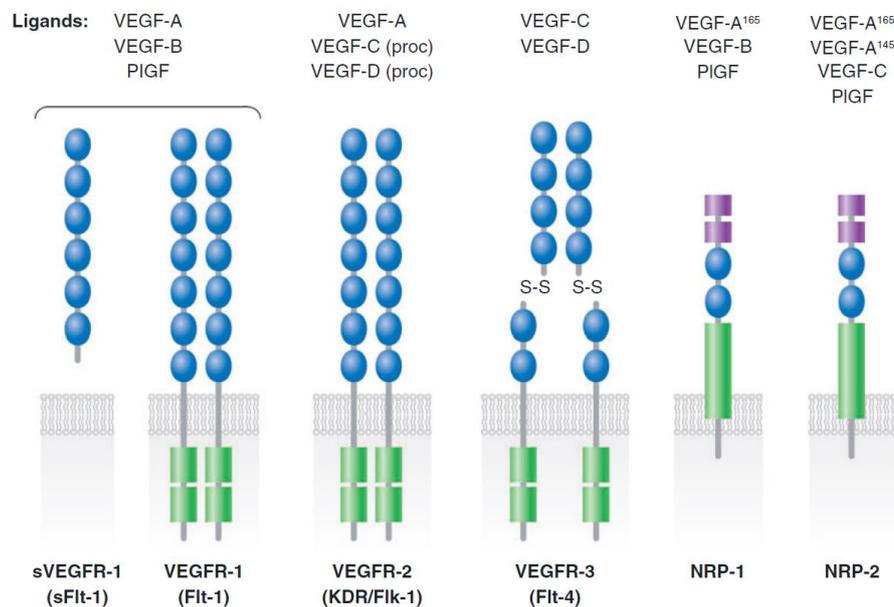


Figure 11 : Représentation schématique des récepteurs de la famille du VEGF et de leurs ligands respectifs. Le VEGF-R1, le VEGF-R2 et le VEGF-R3 sont des récepteurs à activité tyrosine kinase. Le VEGF-R1 existe également sous forme soluble. La NRP-1 et la NRP-2 sont des glycoprotéines transmembranaires, à la fois considérées comme récepteurs de certains membres de la famille du VEGF et comme co-récepteurs des VEGF-R. La NRP-1 et la NRP-2 sont co-récepteurs de VEGF-R1 et de VEGF-R2. La NRP-2 est co-récepteur de VEGF-R3. Les ligands capables d'activer ces récepteurs sont exposés au-dessus de chacun d'eux. D'après Nagy *et al.*, 2007 [72].

⁶⁹Claesson-Welsh, 2003, Biochemical Society Transactions

⁷⁰Ferrara, 2004, Endocrine Reviews

⁷¹Ferrara *et al.*, 2003, Nature Medicine

⁷²Nagy *et al.*, 2007, Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease

⁷³Olsson *et al.*, 2006, Nature Reviews Molecular Cell Biology

⁷⁴Kowanetz et Ferrara, 2006, Clinical Cancer Research

⁷⁵Rousseau *et al.*, 1997, Oncogene

⁷⁶Gerber *et al.*, 1998, The Journal of Biological Chemistry

⁷⁷Jiang *et al.*, 2012, Blood

2.2.2. Les VEGF-R1, -R2 et -R3 : structure et fonctions

Le VEGF-R1 est une glycoprotéine de 180 kD. Son gène comporte 30 exons dont l'épissage alternatif aboutit à une forme soluble de VEGF-R1 (sVEGF-R1) qui possède six domaines IgG-like. La délétion de ce récepteur entraîne une désorganisation du réseau vasculaire et est létale chez la Souris entre le 8^{ème} et le 9^{ème} jour embryonnaire [78].

Le VEGF-R2 est une glycoprotéine de 150 à 230 kDa [79]. L'inactivation du gène de VEGF-R2 entrave le développement vasculaire de l'embryon et entraîne sa mort *in utero* [80]. De même que pour VEGF-R1, il existe une forme soluble de VEGF-R2 qui pourrait exercer un rôle négatif sur l'angiogenèse [81].

Le VEGF-R3 constitue le troisième membre de cette famille de récepteurs. A la différence des deux autres, il est synthétisé sous la forme d'un précurseur composé de sept domaines IgG-like. Ce précurseur subit un clivage protéolytique au niveau du 5^{ème} domaine IgG-like, les deux polypeptides ainsi formés restent liés par un pont disulfure [82].

Le PlGF lie exclusivement le VEGF-R1 et contribue au contrôle des effets du VEGF-A capable de se fixer sur VEGF-R1 et VEGF-R2. Notamment, le VEGF-R1 régule la disponibilité du VEGF-A pour l'activation du VEGF-R2 [83]. Ces facteurs de croissance ont une expression fortement régulée selon le stade de développement. Le PlGF régule les interactions moléculaires entre VEGF-R1 et VEGF-R2 et permet l'installation d'une coopération entre ces deux récepteurs. En particulier, l'activation de VEGF-R1 par le PlGF résulte en la transphosphorylation de VEGF-R2 et en l'amplification de l'angiogenèse dépendante de VEGF-R2 [84].

2.3. Les co-récepteurs

Etant donnée la complexité de la signalisation du VEGF, l'activation de certains récepteurs aux VEGF peut également être contrôlée par des co-récepteurs. En participant à l'orientation vers une voie de signalisation privilégiée, ces co-récepteurs peuvent conduire à des effets différents.

⁷⁸Fong *et al.*, 1999, Development

⁷⁹Waltendberger *et al.*, 1994, Journal of Biological Chemistry

⁸⁰Shalaby *et al.*, 1995, Nature

⁸¹Ebos *et al.*, 2004, Molecular Cancer Research

⁸²Cébe-Suarez *et al.*, 2006, Cellular and Molecular Life Sciences

⁸³Carmeliet *et al.*, 2001, Nature Medicine

⁸⁴Auterio *et al.*, 2003, Nature Medicine

2.3.1. Les neuropilines

Les neuropilines 1 et 2 (NRPs) sont des glycoprotéines de 120 à 130 kDa, constituées d'une portion extracellulaire de 860 acides aminés, d'un domaine transmembranaire de 23 acides aminés et d'un très court domaine intracellulaire d'environ 40 acides aminés. Ces protéines sont capables de lier deux familles différentes de ligand, parmi lesquelles se trouve la famille du VEGF [85]. La neuropiline 1 est en mesure de reconnaître le VEGF-A, le VEGF-B, le VEGF-E et le PlGF et la neuropiline 2 lie quant à elle le VEGF-A et le VEGF-C. En raison de leur court domaine intracytoplasmique, il a été admis que les neuropilines étaient incapables de transmettre un signal intracellulaire et de traduire un message biologique par elles-mêmes. La signalisation relayée par les neuropilines semble donc nécessiter une interaction avec un autre récepteur. En effet, la neuropiline 1 fonctionne en tant que co-récepteur de VEGF-R2 et potentialise la fixation du VEGF-A sur son récepteur principal (le VEGF-R2), se traduisant par une augmentation de la migration des cellules endothéliales [86].

Hormis la neuropiline 1, d'autres protéines, comme le CD146, jouent le rôle de co-récepteur de VEGF-R2.

2.3.2. Le CD146 : un co-récepteur de VEGF-R2

2.3.2.1. Différents noms pour une même protéine

Le CD146 est une glycoprotéine appartenant à la famille des immunoglobulines. Historiquement, elle a été découverte en 1987 et identifiée par le Professeur Johnson en tant que marqueur de cellules malignes chez l'Homme. Elle est alors nommée MUC18 (Mucin 18), et doit cette première appellation à l'anticorps qui a permis de l'identifier [87]. Quatre ans plus tard, l'équipe du Professeur Dignat-George a détecté par cytométrie en flux un marqueur de cellules endothéliales circulantes qu'elle a appelé Sendo-1 [88]. Ce marqueur a, par la suite, été de nombreuses fois rebaptisé : MCAM ou Mel-CAM (*Melanoma Cell Adhesion Molecule*), CD146 (Cluster of Differentiation 146), Gicérine, HEMCAM (*Hemopoietic Cell Adhesion Molecule*). Les deux derniers noms de cette liste (Gicérine et HEMCAM) correspondent à des homologues aviaires de CD146. Finalement, CD146 est l'appellation qui a officiellement été retenue, et regroupe ainsi toutes les autres sous ce même nom.

⁸⁵Guo et Vander Kooi, 2013, Journal of Biological Chemistry

⁸⁶Soker *et al.*, 1998, Cell

⁸⁷Lehmann *et al.*, 1987, Cancer Research

⁸⁸George *et al.*, 1991, Journal of Immunological Methods

2.3.2.2. Structure de la protéine et isoformes

Le gène du CD146 est localisé chez l'Homme sur le chromosome 11 et chez la Souris sur le chromosome 9. La structure protéique de CD146 comporte cinq domaines extracellulaires de type V-V-C₂-C₂-C₂, une partie transmembranaire et une partie intracellulaire. Une isoforme longue (lgCD146) et une isoforme courte de CD146 (shCD146) générées par un épissage alternatif ont été identifiées (**Figure 12**).

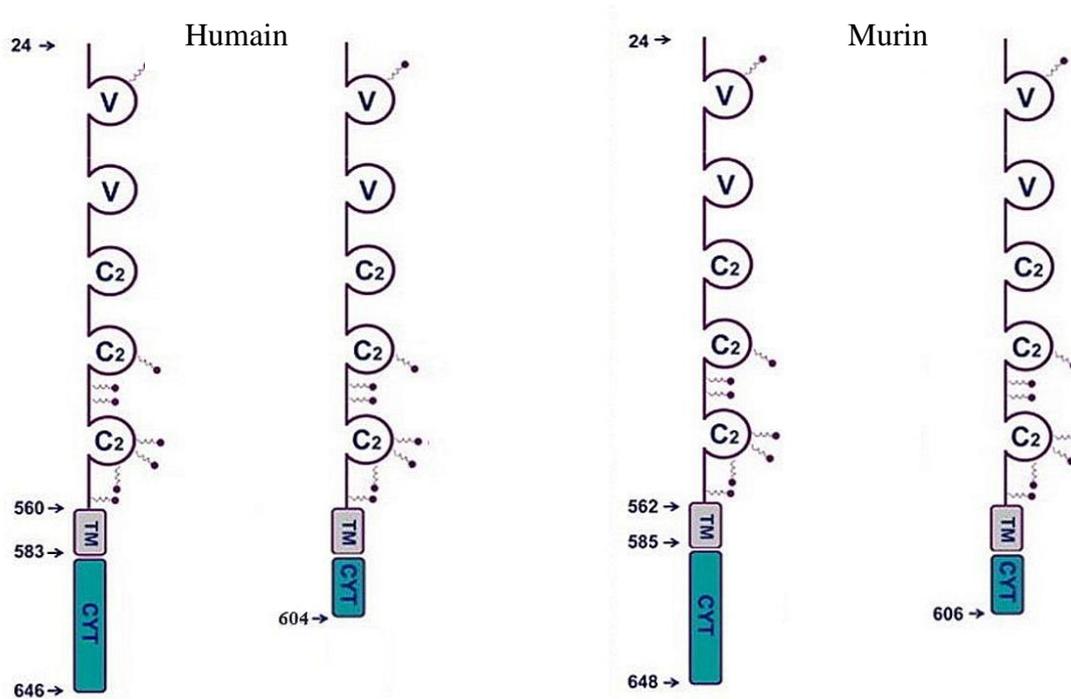


Figure 12 : Illustration de la structure protéique des isoformes longue et courte du CD146 humain et murin. La partie extracellulaire de la protéine CD146 présente une structure de type immunoglobuline. La partie extracellulaire et la partie transmembranaire sont identiques quelle que soit l'isoforme. L'isoforme longue se distingue de l'isoforme courte par la partie intracellulaire, qui est composée de 63 acides aminés pour l'isoforme longue et de 21 pour l'isoforme courte. TM : domaine transmembranaire ; CYT : domaine cytoplasmique. Modifiée d'après Wang et Yan, 2013 [89].

La séquence extracellulaire est commune aux deux isoformes, la différence réside dans la portion intra cytoplasmique [90]. Cette particularité confère à lgCD146 une séquence signal d'endocytose et deux domaines de phosphorylation de la PKC et à shCD146 un domaine de liaison à motif PDZ et un domaine de phosphorylation de la PKC [91]. Le domaine intracytoplasmique est fortement conservé d'une espèce à l'autre, il est similaire chez l'Homme

⁸⁹Wang et Yan, 2012, Cancer letters

⁹⁰Taira *et al.*, 1995, Journal of Biological Chemistry

⁹¹Alais *et al.*, 2001, Journal of Cell Science

et la Souris à 95 % pour l'isoforme courte et à 93 % pour l'isoforme longue. En plus de ces deux isoformes membranaires, une forme soluble de CD146 existe et est générée par clivage protéolytique de la partie extracellulaire de CD146 par un mécanisme dépendant des métalloprotéinases matricielles [92, 93]. Chaque isoforme membranaire présente une localisation qui lui est propre. De plus, l'état de confluence de la cellule semble réguler la distribution spatiale des deux isoformes. Dans les cellules endothéliales non confluentes, IgCD146 est uniquement retrouvée en intracellulaire alors que shCD146 est principalement détectée au niveau du noyau et du pôle apical de migration membranaire. Lorsque les cellules sont à confluence, IgCD146 est exclusivement localisée à la jonction intercellulaire et shCD146 est redistribuée à la membrane apicale de la cellule endothéliale [94].

2.3.2.3. CD146 : plus qu'un co-récepteur de VEGF-R2

L'existence d'une interaction entre le CD146 et le VEGF-R2 dans le domaine extracellulaire du récepteur a été mise en évidence en 2012 par Jiang et collaborateurs dans les cellules endothéliales et a permis d'établir un lien entre le CD146 et ses propriétés angiogéniques. De plus, il a été montré par cette même équipe qu'en utilisant un anticorps anti-CD146 (AA98), la phosphorylation de VEGF-R2 induite par le VEGF-A était supprimée dans les cellules endothéliales de la veine ombilicale ([77]; **Figure 13**).

⁹²Bardin *et al.*, **1998**, Federation of European Biochemical Societies Letters

⁹³Boneberg *et al.*, **2009**, Microvascular Research

⁹⁴Kebir *et al.*, **2010**, Circulation Research

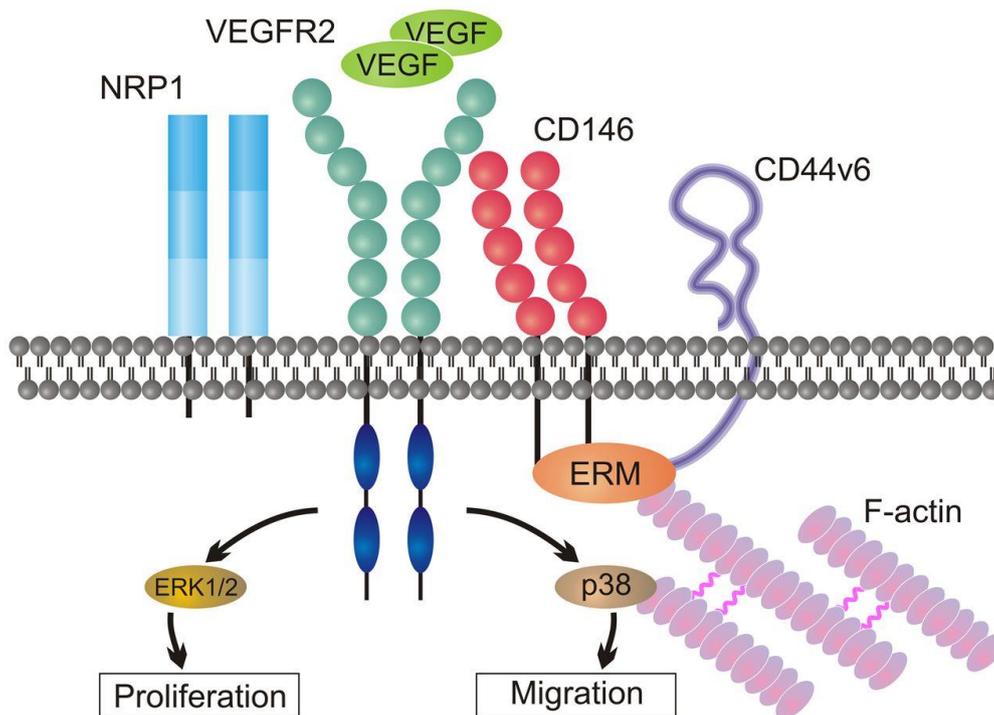


Figure 13 : Schéma illustrant les interactions entre le récepteur VEGFR-2 et son co-récepteur CD146. La présence de CD146 oriente l'action du VEGF-A vers la migration cellulaire. Le co-récepteur CD146 contribue, *via* son domaine extracellulaire, à la liaison du VEGF-A sur VEGFR-2. De plus, son extrémité cytoplasmique *via* la protéine *Ezrin-Radixin-Moesin* (ERM) oriente la voie de signalisation du VEGFR-2 vers la MAP kinase p38 au détriment de la MAP kinase ERK1/2. CD44v6 : *Cluster of Differentiation 44 variant 6* ; ERK : *Extracellular signal-regulated kinase* ; F-actin : *filamentous actin*. D'après Jiang *et al.*, 2012 [77].

Une étude plus récente montre de manière plus spécifique que l'isoforme courte du CD146 forme avec l'angiomin, la préséniline-1 (PS-1), et les récepteurs 1 et 2 du VEGF, un réseau moléculaire complexe dans les cellules endothéliales. Dans cette même étude, l'activation par la forme soluble du CD146 d'une sous-population de progéniteurs endothéliaux tardifs entraîne une interaction dynamique entre VEGF-R1, VEGF-R2, l'angiomin, la présénilin-1 et shCD146 ([95] ; **Figure 14**).

⁹⁵Stalin *et al.*, 2016, Cardiovascular research

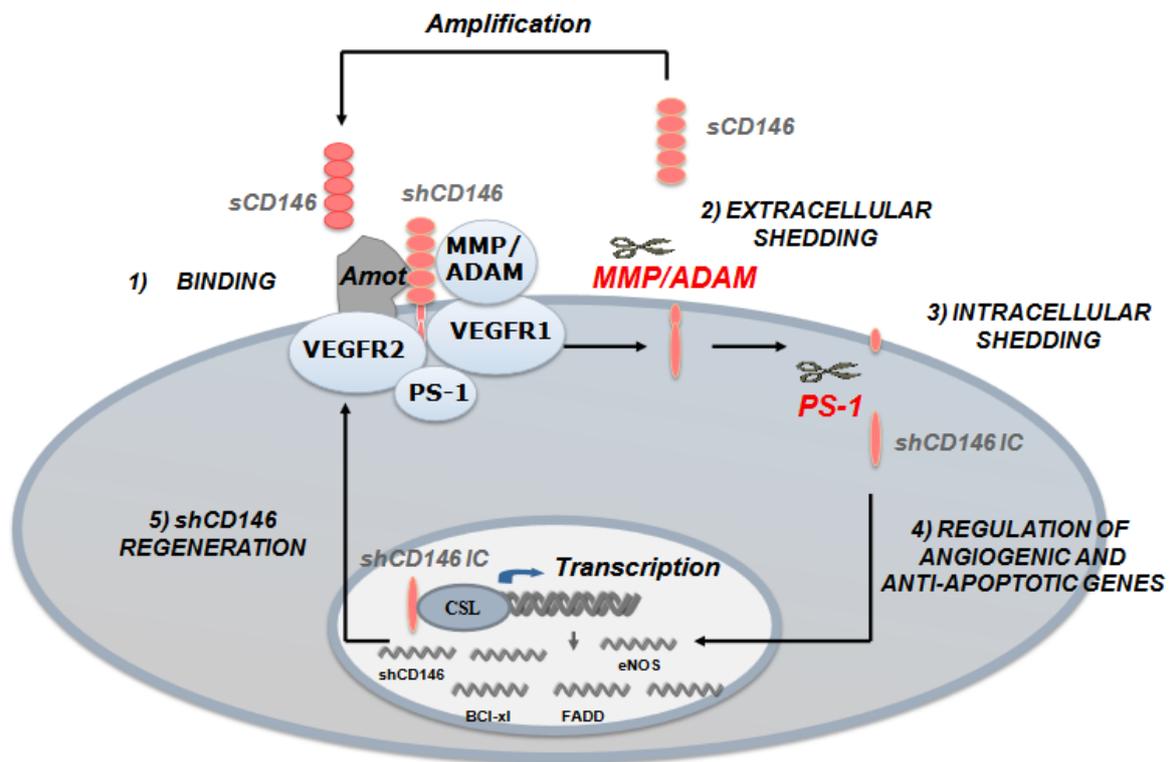


Figure 14 : Schéma résumant le mécanisme d'action de CD146 soluble dans les cellules endothéliales. Le CD146 soluble, en se liant à l'angiomotin, (1) déclenche le clivage de shCD146 par deux mécanismes : un mécanisme dépendant de métalloprotéinases (2) générant du CD146 soluble qui sera de nouveau en capacité de se lier à l'angiomotin, et un mécanisme dépendant de PS-1, (3) qui produit un fragment intracellulaire de CD146 (shCD146 IC). Ce fragment intracellulaire va migrer jusqu'au noyau et (4) va intervenir dans la régulation de gènes anti-apoptotique et pro-angiogénique, tels que Bcl-x1 ou shCD146, (5) qui ira ensuite se relocaliser à la membrane. D'après Stalin *et al.*, 2016 [95].

2.3.2.4. Fonction biologique du CD146 et son implication dans les processus pathologiques

Le CD146 est impliqué dans de nombreux processus physiologiques. Cette protéine a été décrite comme jouant un rôle crucial dans le développement vasculaire et dans l'angiogenèse. En effet, l'inactivation du CD146 par l'utilisation des morpholinos entrave le développement vasculaire chez le *Zebrafish* [96].

La découverte de l'existence de deux isoformes de CD146 et la description d'une forme soluble ont mené à l'étude de leurs implications dans les processus angiogéniques. L'absence de l'isoforme courte diminue la prolifération, la migration et l'adhésion des cellules endothéliales,

⁹⁶Chan et al., 2005, Developmental Dynamics

alors que la surexpression amène au phénomène inverse. L'isoforme longue, quant à elle, est impliquée dans la formation des tubes pseudo capillaires *in vitro* et la stabilisation des jonctions endothéliales des nouveaux vaisseaux [97]. Ces deux isoformes sont donc complémentaires. A cela, s'ajoute les effets angiogéniques de CD146 soluble sur la migration des progéniteurs endothéliaux circulants [98]. Par ailleurs, le signalosome de CD146 est essentiel à l'activation des différentes voies de signalisation (p38, Akt, ERK), l'absence de l'isoforme courte de CD146 diminue en effet la phosphorylation de VEGF-R2 dans les cellules endothéliales et empêche l'effet pro-angiogénique du VEGF [95].

Tout comme d'autres molécules de jonction cellulaire, le CD146 est également un acteur de l'inflammation et module la migration des leucocytes à travers l'endothélium vasculaire [99]. Enfin, le CD146 a également été identifié comme jouant un rôle dans la croissance des cellules cancéreuses et leur dissémination [89].

⁹⁷Harhoury *et al.*, 2010, Blood

⁹⁸Stalin *et al.*, 2013, Journal of Biological Chemistry

⁹⁹Bardin *et al.*, 2009, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology

3. Le placenta : une source de facteur pro-angiogénique

Le placenta est un organe éphémère indispensable au maintien de la grossesse et à la croissance du fœtus. Le fœtus est tributaire de la qualité développementale du placenta. La moindre altération placentaire peut menacer le bon déroulement de la grossesse et avoir des effets délétères sur le développement du fœtus.

3.1. Le développement du placenta humain

3.1.1. Implantation embryonnaire et formation de la villosité choriale

Chez l'Homme, le placenta se développe une semaine après la fécondation (**Figure 15**). Dès lors, le blastocyste a atteint la cavité utérine et s'accroche à l'épithélium utérin par son assise trophoblastique [100]. Après avoir assuré les premières étapes de son développement, le blastocyste a épuisé l'intégralité de ses réserves nutritives et ne peut donc plus subvenir à ses besoins énergétiques et métaboliques. Afin de pallier à ce déficit, l'implantation du blastocyste va se traduire par la différenciation d'une structure qui lui permettra de se développer : il s'agit du placenta. Bien plus qu'une interface physique entre la future mère et l'enfant, le placenta assure des fonctions essentielles à la croissance fœtale. Il intervient dans l'élimination des déchets et apporte au fœtus l'oxygène et les nutriments indispensables à son développement [101], assure une fonction de barrière immunitaire contre les attaques virales et bactériennes [101], et sécrète des hormones telles que l'hormone de croissance placentaire (PGH) ou l'hormone lactogène placentaire (hPL ; [102]). Le développement du placenta se poursuit tout le long de la gestation et s'adapte ainsi de manière progressive aux besoins métaboliques croissants du fœtus. Au contact de la paroi utérine, le cytotrophoblaste se différencie en syncytiotrophoblaste (**Figure 15**). Ces cellules possèdent plusieurs noyaux et sont issues de la fusion d'une cellule et d'un virus ou de la fusion de plusieurs cellules entre elles [103, 104]. Les syncytiotrophoblastes assurent une fonction d'ancrage et vont permettre l'enfouissement complet du blastocyste dans l'épithélium utérin [105, 106, 107, 108 ; (**Figure 15**)].

¹⁰⁰Benirschke et Kaufmann, 1991, Pathology of the Human Placenta

¹⁰¹Gude *et al.*, 2004, Thrombosis Research

¹⁰²Alsat *et al.*, 1998, Molecular and Cellular Endocrinology

¹⁰³Blaise *et al.*, 2003, Proceedings of the National Academy of Sciences

¹⁰⁴Dupressoir *et al.*, 2012, Placenta

¹⁰⁵Aplin, 1991, Journal of Cell Science

¹⁰⁶Cross *et al.*, 1994, Science

¹⁰⁷Kaufmann et Scheffen, 1990, Neonatal and fetal medicine-physiology and pathophysiology

¹⁰⁸Benirschke et Kaufmann, 2000, Pathology of the Human Placenta

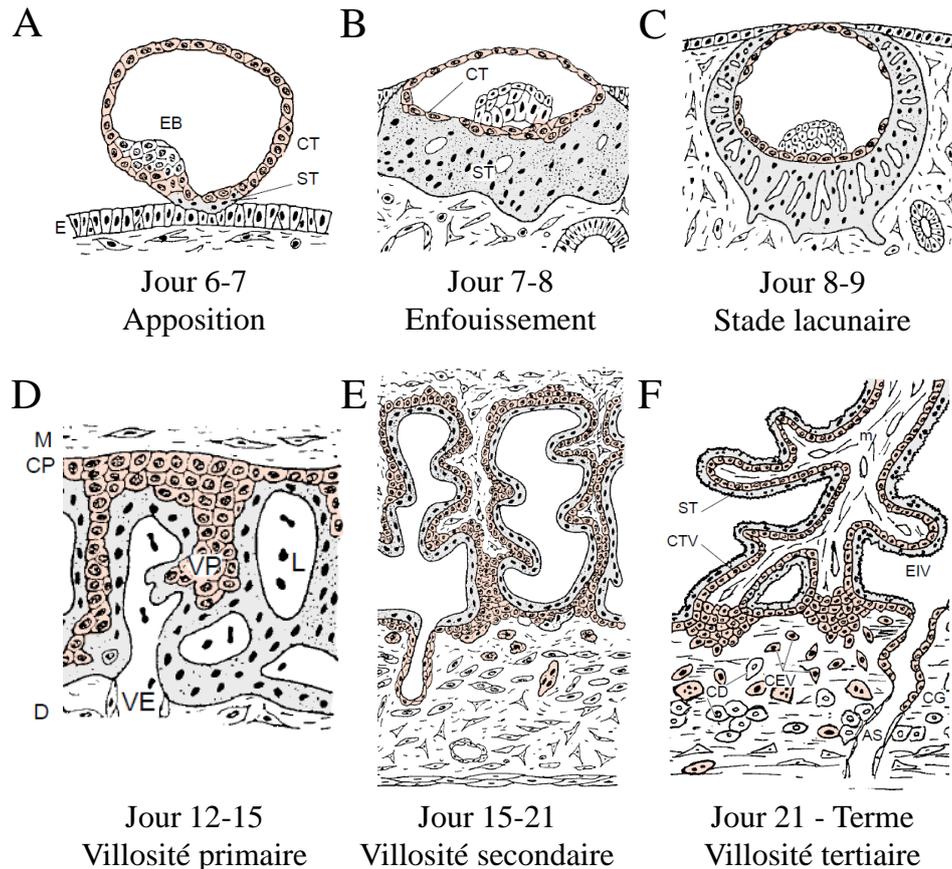


Figure 15 : Représentation schématique des principaux stades du développement placentaire. (A) et (B) Le blastocyste se différencie en bouton embryonnaire (EB) et en cytotrophoblaste (CT). Au contact de l'épithélium utérin (EU), le cytotrophoblaste se différencie en syncytiotrophoblaste (ST). Les syncytiotrophoblastes vont permettre l'ancrage et l'enfouissement complet du blastocyste dans l'épithélium utérin (EU), réalisant le processus d'implantation. (C) et (D) Les syncytiotrophoblastes sont très invasifs et forment une masse dans laquelle apparaissent des lacunes (L). Les cytotrophoblastes envahissent les syncytiotrophoblastes inter lacunaires et façonnent la villosité chorale. (E) Le mésenchyme embryonnaire (EM) prolifère et envahit les colonnes de cytotrophoblastes selon un axe, permettant la croissance de la villosité qui est alors qualifiée de secondaire. (F) Les vaisseaux fœtaux se développent au sein de l'axe mésenchymateux, formant la villosité chorale tertiaire qui est dans sa structure définitive. CEV : CT extravilleux ; EIV : espace intervilloux ; CD : cellule déciduale ; CG : cellule géante ; VP : villosité primaire ; M : mésenchyme ; CP : plaque chorale ; D : décidue ; AS : artère spiralée. D'après Benirschke et Kaufmann, 2000 [108].

Ces cellules sont très invasives, elles forment une masse dans laquelle apparaissent des lacunes, qui en fusionnant créent l'espace intervilloux. Le cytotrophoblaste prolifère et s'engouffre dans le syncytiotrophoblaste, façonnant peu à peu la villosité chorale. La villosité chorale est l'unité structurale et fonctionnelle du placenta [108 ; (Figure 15)]. Dans sa structure définitive, la

villosité chorale est flottante dans la chambre intervillieuse ou ancrée dans l'utérus, et est bordée d'une couche de trophoblastes et d'un syncytium qui assurent les fonctions d'échanges fœto-maternels.

3.1.2. La différenciation trophoblastique

Au sein de la villosité chorale, le cytotrophoblaste se différencie en suivant deux voies distinctes (**Figure 16**). Il y a, d'une part, la voie qui conduit aux cytotrophoblastes extravillieux (CTEV) et d'autre part, celle qui conduit aux cytotrophoblastes villeux (CTV). Les CTEV, invasifs, sont indispensables à l'implantation et au remodelage des vaisseaux utérins alors que les CTV, qui recouvrent la villosité flottante, créent par fusion cellulaire le syncytiotrophoblaste qui assurera les échanges fœto-maternels et les fonctions endocrines du placenta [109].

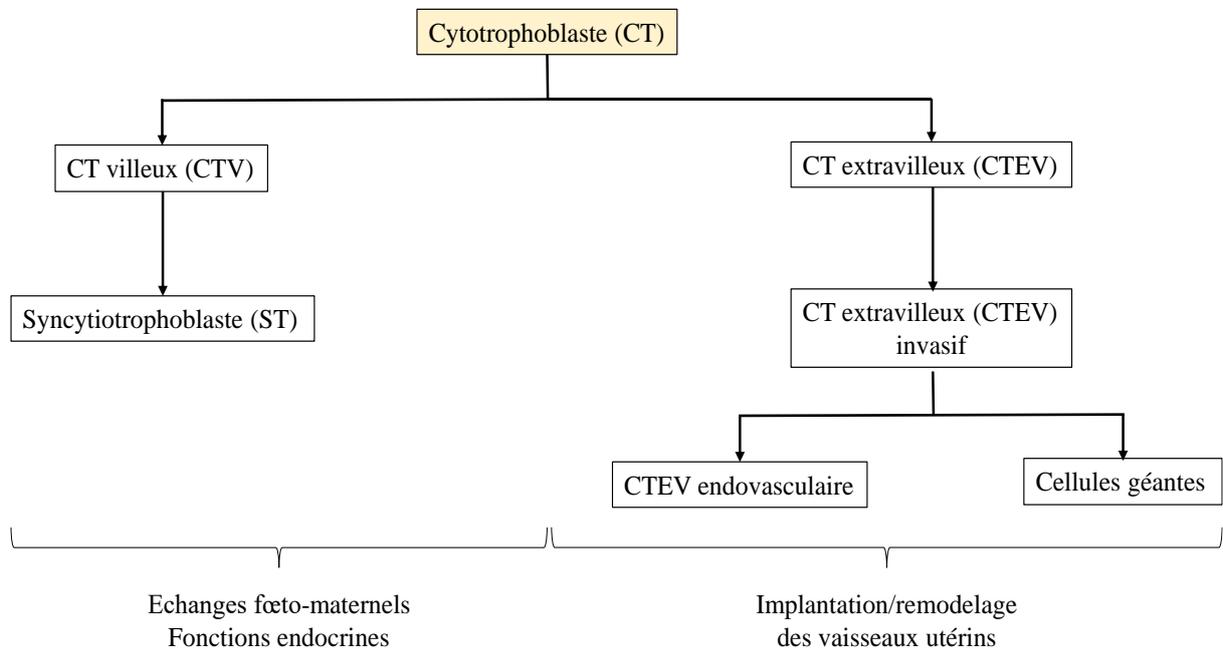


Figure 16 : Principales voies de différenciation du cytotrophoblaste humain. Le cytotrophoblaste villeux (CTV) est une cellule mononucléée qui a la propriété de fusionner pour former le syncytiotrophoblaste (ST). Le cytotrophoblaste extravillieux (CTEV) prolifère, puis devient invasif. Il migre ensuite dans la décidue et le premier tiers du myomètre. Il colonise les vaisseaux maternels et peut se différencier en CTEV endovasculaire ou en cellules géantes. Modifiée d'après Evain-Brion, 2001 [109].

¹⁰⁹Evain-Brion, 2001, Gynécologie, Obstétrique & Fertilité

3.2. Mise en place de la circulation fœto-maternelle et remodelage des artères spiralées utérines

3.2.1. Mise en place de la circulation fœto-placentaire

La circulation entre l'embryon et le placenta s'établit 23 jours après la fécondation, au moment de l'apparition des premiers battements cardiaques embryonnaires. Le cordon ombilical, qui relie la face fœtale du placenta à l'ombilic de l'embryon, est composé de deux artères qui conduisent le sang de l'embryon vers le placenta et d'une veine qui ramène le sang vers le cœur de l'embryon. La circulation fœto-placentaire est un système clos. Le sang fœtal ne sera donc jamais en contact avec le sang maternel qui circule dans la chambre intervillieuse.

3.2.2. Mise en place de la circulation maternelle

En parallèle, la circulation maternelle s'établit véritablement avec le remodelage des artères spiralées (**Figure 17**). Ces dernières subissent une transformation progressive en artères utéro-placentaires dans la zone d'implantation du blastocyste essentiellement. Le remodelage des artères spiralées est un processus physiologique fondamental au bon développement fœtal [110] car il permet un apport de sang en grande quantité dans la chambre intervillieuse à partir de la 12^{ème} semaine aménorrhée. Ce remodelage peut schématiquement être divisé en trois étapes :

- le remodelage vasculaire du myomètre indépendant de l'invasion trophoblastique ;
- le remodelage vasculaire induit par des facteurs capables de diffuser à partir du trophoblaste invasif ;
- le remodelage induit par une interaction directe entre le trophoblaste invasif et les composants de la paroi artérielle.

¹¹⁰Pijnenborg *et al.*, 2006, Placenta

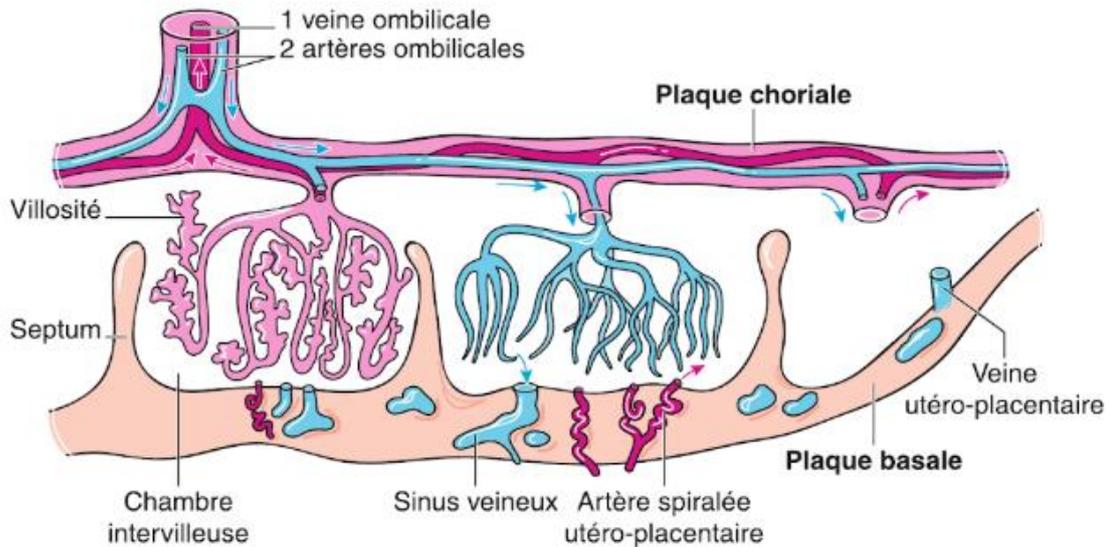


Figure 17 : La circulation sanguine du placenta. Le sang fœtal arrive par les deux artères ombilicales et repart par la veine ombilicale. Le sang maternel arrive par les artères spiralées utérines qui s'ouvrent dans la chambre intervillieuse. Après avoir irrigué les villosités chorales, le sang regagne l'organisme maternel grâce aux sinus veineux. D'après Duc-Goiran *et al.*, 1994 [111].

3.2.3. Régulation moléculaire de l'angiogenèse placentaire

La vasculogénèse et l'angiogenèse ont une importance capitale dans le développement placentaire et la croissance fœtale. La régulation moléculaire de ces deux processus dépend notamment de facteurs de croissance parmi lesquels le VEGF-A et le PlGF peuvent être cités. En effet, ces deux protéines jouent un rôle important dans le contrôle de la perméabilité vasculaire placentaire et dans les remaniements vasculaires nécessaires à l'implantation [112, 113].

Durant les premières semaines de gestation, le VEGF-A est fortement exprimé par les cellules trophoblastiques. Toutefois, son expression diminue avec l'état d'avancement de la grossesse [114, 115]. Cette diminution est parallèlement associée à une augmentation de la production de PlGF par les cellules trophoblastiques [116]. Le VEGF-R1, également nommé Flt-1, est un récepteur du VEGF-A et du PlGF, qui existe également sous une forme soluble (sVEGF-R1 ou sFlt-1). Cette forme soluble est dépourvue de domaines cytoplasmique et transmembranaire et ne peut donc pas traduire de signal biologique. Cependant, elle conserve son domaine de liaison

¹¹¹Duc Goiran *et al.*, 1994, Dossier Documentaire – Inserm

¹¹²Achen *et al.*, 1997, Growth Factors

¹¹³Plaisier *et al.*, 2007, Fertility Sterility

¹¹⁴Cooper *et al.*, 1996, British Journal of Obstetrics and Gynaecology

¹¹⁵Kingdom *et al.*, 2000, European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology

¹¹⁶Khaliq *et al.*, 1996, Growth Factors

au VEGF-A et au PlGF [117]. Elle est capable de séquestrer ces deux ligands circulants, régulant l'interaction avec leurs récepteurs membranaires et permettant leur transport par voie sanguine. Toutefois, sFlt-1 a une affinité plus importante pour le VEGF que pour le PlGF, et ceci explique l'effondrement des taux sériques de VEGF observé au cours de la grossesse [118, 119]. De plus, des études ont montré qu'une dérégulation du ratio sVEGF-R1/PlGF est un indicateur de dysfonctionnement placentaire associé à la prééclampsie, au décollement placentaire ou encore au retard de croissance intra-utérin (RCIU), autant de causes susceptibles d'entraîner la mort de la mère et/ou du fœtus [120, 121, 122, 123].

3.3. Comparaison entre le placenta humain et le placenta murin

Les placentas humain et murin sont de morphologie discoïde et présentent deux faces, l'une maternelle et l'autre fœtale. Toutefois, les zones d'échange fœto-maternelle humaine et murine présentent des différences. Chez la femme, elle est hémomonochoriale et les échanges ont lieu au niveau des villosités choriales flottantes. Chez la Souris, elle est hémotrichoriale et les échanges s'effectuent dans le labyrinthe. Ces deux régions sont, sur le plan fonctionnel, analogues mais se distinguent sur le plan structural. Ainsi, la zone d'échange chez la femme s'apparente à une arborisation tandis que chez la Souris, elle a une structure labyrinthique (**Figure 18**).

De plus, les placentas humain et murin sont dits chorio-allantoïdien, c'est-à-dire que la circulation placentaire choriale est reliée à la circulation fœtale allantoïdienne. Chez la femme, la couche la plus externe des villosités choriales est composée d'une couche de trophoblastes, tandis que le centre des villosités est constitué de mésenchyme allantoïdien et de vaisseaux qui sont en continuité avec ceux du cordon ombilical [124].

¹¹⁷He *et al.*, 1999, Molecular Endocrinology

¹¹⁸Luttun et Carmeliet, 2003, Journal of Clinical Investigation

¹¹⁹Tsatsaris *et al.*, 2003, The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism

¹²⁰Friedman et Cleary, 2014, Seminars in Perinatology

¹²¹Souders *et al.*, 2015, International Journal of Molecular Sciences

¹²²Saleh *et al.*, 2016, Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease

¹²³Biberoglu *et al.*, 2016, the Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine

¹²⁴Downs et Bertler, 2000, Anatomy and Embryology

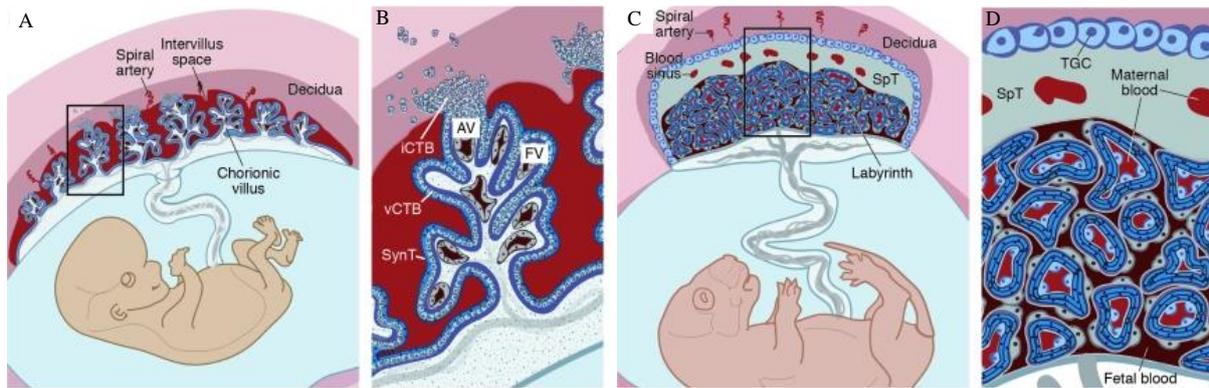


Figure 18 : Comparaison anatomique des placentas humain et murin. (A-B) Le placenta humain et **(C-D)** le placenta murin sont de type hémochorial, ce qui signifie que le sang maternel est directement au contact des villosités choriales. **(A)** Illustration de la structure placentaire humaine. Le détail d'une villosité choriale est visualisé en **(B)**. CTV : cytotrophoblaste villositaire ; CTEV : cytotrophoblaste extravillositaire ; CTG : cellule trophoblastique géante ; SpT : cellules progénitrices des CTG ; ST : syncytiotrophoblaste ; VC : villosité choriale ; VF : villosité flottante. D'après Maltepe *et al.*, 2010 [125].

3.4. Impact d'une alcoolisation maternelle sur le placenta

3.4.1. Le placenta, une surface d'échanges materno-fœtale

Les échanges placentaires se font selon des mécanismes classiques de transport passif, de transport actif et de transport vésiculaire. Le placenta exerce une fonction respiratoire, une fonction nutritive, une fonction d'excrétion et une fonction de protection, avec le passage de diverses substances à travers la barrière placentaire (**Figure 19**). Le passage des substances à travers la barrière placentaire se fait selon différents processus tels que la liposolubilité, le poids moléculaire, l'état d'ionisation et la liaison aux protéines plasmatiques des molécules.

¹²⁵Maltepe *et al.*, 2010, The American Society for Clinical Investigation

Mère	Placenta	Fœtus
Dioxygène	Respiration Transport passif	Dioxyde de Carbone
Glucose	Nutrition Transport passif	
Lipides	Transport passif	
Acides aminés	Transport actif	
	Excrétion Transport passif	Eau Déchets
IgG	Protection Transport vésiculaire	

Figure 19 : Principaux types de transport placentaire permettant les échanges entre la mère et le fœtus. Le placenta est une interface d'échanges sélectifs entre la mère et le fœtus. Les échanges s'effectuent par divers mécanismes de transport actif, passif ou vésiculaire en fonction de la nature des éléments échangés et de la polarité du placenta. Le transport des gaz respiratoires est passif et se fait par diffusion simple. Le passage du glucose s'effectue par diffusion facilitée grâce aux transporteurs au glucose, Glut1 et Glut3, qui sont respectivement situés au niveau des membranes plasmiques des trophoblastes et des capillaires sanguins. Concernant les lipides, ils ne traversent pas la barrière placentaire. Ils sont synthétisés par le fœtus à partir des acides gras libres et du glycérol qui peuvent pénétrer dans le trophoblaste par diffusion simple ou par différents transporteurs. Le passage transplacentaire des acides aminés est réalisé par transport actif et nécessite une dépense d'énergie impliquant les pompes Na^+/K^+ ATPase, Mg^{2+} dépendante. L'eau traverse le placenta dans un premier temps par diffusion dans le sens d'un gradient osmolaire, puis *via* des protéines transmembranaires (les aquaporines). Les électrolytes suivent les mouvements hydriques et permettent de maintenir le gradient électrochimique, mais le fer et le calcium ne passent que dans le sens mère-fœtus. Enfin, le système immunitaire du fœtus est immature, le passage transplacentaire des immunoglobulines G s'effectue par transendocytose. Glut : transporteur de glucose ; Na^+/K^+ ATPase : sodium/potassium adénosine triphosphatase ; IgG : immunoglobuline G. D'après Simister, 2003 [126] ; Cleal et Lewis, 2008 [127] ; Beall *et al.*, 2007 [128].

¹²⁶Simister, 2003, Vaccine

¹²⁷Cleal et Lewis, 2008, Journal of Neuroendocrinology

¹²⁸Beall *et al.*, 2007, Placenta

3.4.2. Anomalies placentaires rencontrées lors d'une alcoolisation maternelle durant la grossesse

Le placenta permet non seulement d'apporter au fœtus les nutriments et le dioxygène dont il a besoin pour se développer mais également de le protéger contre certains agents pathogènes. Toutefois, de nombreuses substances toxiques peuvent échapper au contrôle de cette barrière imparfaite. A titre d'exemple, l'alcool traverse très facilement la barrière placentaire, et à l'instar de tous les organes fœtaux, le placenta est susceptible de subir les atteintes d'une alcoolisation maternelle [129, 130, 131].

Les anomalies placentaires rencontrées suite à une consommation d'alcool au cours de la grossesse ne sont en effet pas négligeables. Une étude a décrit une diminution du flux sanguin placentaire, une diminution du transfert des nutriments (tels que la biotine, la vitamine B6, les acides aminés, l'adénosine, le zinc, les acides gras), une réduction des surfaces d'échanges au niveau des villosités flottantes, et des perturbations de la production placentaire de molécules essentielles à la sphère fœto-maternelle (comme le thromboxane, les prostaglandines, les cytokines, les facteurs de croissance). Ces anomalies sont à l'origine du retard de croissance *in utero* (RCIU) observé chez les fœtus et les nouveau-nés exposés à l'alcool pendant la gestation [132].

Par ailleurs, une analyse du transcriptome chez le rat *Long-Evans* a mis en évidence, dans les placentas exposés à l'alcool, une altération de l'expression de gènes codant des protéines impliquées dans le développement du système nerveux central, dans la morphogénèse des organes, dans la fonction endocrine ou encore dans l'angiogenèse [133]. Cette étude a notamment fait ressortir une diminution significative des taux d'ARN messagers codant le PIGF. Des travaux récents du Laboratoire ont révélé qu'une répression placentaire du PIGF chez la Souris induisait des anomalies de l'angiogenèse cérébrale chez le fœtus, comparables à celles retrouvées chez l'Homme suite à une alcoolisation *in utero* [67]. De plus, le dosage placentaire du PIGF a démontré une forte réduction des taux chez les enfants exposés *in utero* à l'alcool. Ces données suggèrent un effet de l'alcool sur l'expression des membres de la famille du VEGF au niveau placentaire et un impact au niveau vasculaire cérébral.

¹²⁹Yang *et al.*, 2015, PLoS One

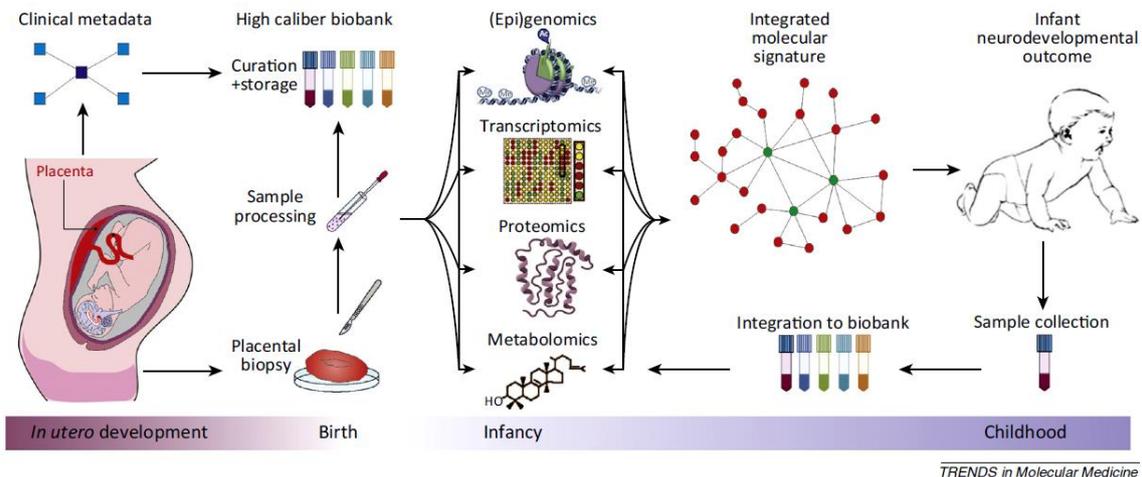
¹³⁰Gundogan *et al.*, 2015, Placenta

¹³¹Popova *et al.*, 2016, Lancet

¹³²Burd *et al.*, 2007, The journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine

¹³³Rosenberg *et al.*, 2010, Alcohol

A la lumière de ces éléments, le placenta est devenu ces dernières années une source potentielle de biomarqueurs de troubles du développement fœtal (**Figure 20**). De ce fait, le placenta pourrait servir d'outils diagnostic et ainsi prédire les troubles neurodéveloppementaux survenant à la suite d'une exposition prénatale à l'alcool qui sont parfois dépistés beaucoup trop tardivement chez l'enfant [134, 135].



TRENDS in Molecular Medicine

Figure 20 : Le placenta, source de biomarqueurs de troubles du développement cérébral.

Des approches ciblées ou intégrées, telles que les techniques « -omiques » utilisant le placenta, constituent de nouvelles stratégies pour prédire le devenir neurodéveloppemental de l'enfant. En tant qu'interface materno-fœtale jouant un rôle critique durant la grossesse, le placenta constitue un indicateur moléculaire de la vie *in utero*. Des biopsies placentaires permettent de générer des banques de métadonnées associées à certaines anomalies neurodéveloppementales comme celles associées à l'alcoolisation *in utero*. Des analyses omiques seraient ainsi en mesure de générer une signature moléculaire du placenta à la naissance et de prédire le futur neurodéveloppemental de l'enfant. Ultérieurement, les échantillons sanguins collectés chez ces enfants sont intégrés dans la banque de métadonnées afin d'établir une comparaison rétrospective avec la signature moléculaire du placenta à la naissance. D'après O'Keeffe et Kenny, 2014 [134].

¹³⁴O'Keeffe et Kenny, 2014, Trends in Molecular Medicine

¹³⁵Davis-Anderson *et al.*, 2017, Alcoholism: Clinical and Experiment Research

4. Effet de l'alcoolisation *in utero* sur la neurogenèse et l'angiogenèse

4.1. Le syndrome d'alcoolisation fœtale (SAF) et l'ensemble des troubles causés par l'alcoolisation fœtale (ETCAF)

4.1.1. Historique

Alcool et maternité ne font pas bon ménage et cela n'est pas une nouveauté. Cette intuition était déjà présente dans l'Antiquité. Chez les Grecs Anciens, une loi interdisait formellement aux jeunes époux de consommer de l'alcool le soir de leurs noces pour éviter les malformations chez l'enfant qui pourrait potentiellement être conçu. Dans la Bible, les écritures invitent les futures mères à être lucides sur les dangers qui accompagnent la consommation d'alcool. Dans le Livre des Juges, l'Ange envoyé par Yahvé à l'épouse de Manoah pour lui annoncer sa grossesse, la met en garde : « *Tu es stérile et tu n'as pas eu d'enfant mais tu vas concevoir et enfanteras un fils* ». Il lui enjoint explicitement : « *Ne bois ni vin, ni boisson fermentée, et ne mange rien d'impur* » [136]. Au fil des siècles, de nombreux écrivains et artistes se sont essayés à transcrire dans leurs œuvres les conséquences délétères de l'alcoolisation maternelle sur l'enfant. Le peintre William Hogarth, auteur de la gravure *Gin Lane* publiée dans le cadre de la campagne pour la répression et le contrôle de la vente et de la consommation de Gin, dénonce les ravages engendrés par la baisse des taxes sur la vente de Gin dans l'Angleterre du 17^e et du 18^e siècle [136 ; (Figure 21)].



Figure 21 : Gravure « *Gin Lane* » de William Hogarth, publiée en 1751 dans le cadre de la campagne pour la répression et le contrôle de la vente et de la consommation du Gin. Après l'adoption du *Gin Act* en 1751, les effets d'une surconsommation de Gin fut immortalisée dans la gravure de William Hogarth. Au premier plan de cette gravure, Hogarth met en scène une femme ivre laissant tomber son bébé par-dessus la balustrade. Cette scène dénonce les ravages causés par la baisse des taxes sur la vente de Gin dans l'Angleterre du 17^{ème} et du 18^{ème} siècle. *Gin Lane*, 1751, gravure, Londres, British Museum.

¹³⁶Dehaene, 1995, Presses Universitaires de France

Puis à l'orée du 20^{ème} siècle, naissent les premières expérimentations scientifiques. Les recherches expérimentales menées par Maurice Nicloux figurent parmi les plus remarquables. Ce biochimiste français fut le premier à étudier, de manière peu orthodoxe certes, la diffusion de l'alcool de l'organisme maternel à l'organisme fœtal. Une heure avant l'accouchement environ, il faisait absorber aux femmes en travail, une potion de Todd composée de Rhum à 45% d'alcool absolu, de lait et de sirop de sucre. Immédiatement après l'expulsion du fœtus, le sang fœtal était recueilli. Ses méthodes, bien que très discutables, ont permis de mettre en évidence que les teneurs en alcool du sang maternel et du sang fœtal sont très voisines, sinon égales (**Table 2**). Il parlera « *d'alcoolisme congénitale* » [137].

Numéros des recherches	Quantité d'alcool absolu ingéré	Temps séparant l'ingestion de l'accouchement	Quantité d'alcool absolu pour 100 ^{cc} de sang fœtal
I	27 ^{cc}	1 ^h 15	0 ^{cc} 017
II	27 ^{cc}	1 ^h	0.037
III	27 ^{cc}	1 ^h 7'	0.053
IV	27 ^{cc}	40'	0.031
V	27 ^{cc}	1 ^h	0.021
VI	27 ^{cc}	1 ^h 10'	0.014

Table 2 : Tableau récapitulatif du passage de l'alcool ingéré de la mère au fœtus chez la femme [137].

4.1.2. La description d'un syndrome

Les premières descriptions médicales des effets néfastes de l'alcool sur le développement de l'enfant apparaissent en 1957 dans une thèse de médecine intitulée « *Influence de la toxicomanie alcoolique parentale sur le développement physique et psychologique de jeunes enfants* », soutenue par Jacqueline Rouquette. L'observation de 100 enfants issus de parents alcooliques lui a permis de dresser un portrait spécifique associant retard de croissance et faciès caractéristique. Paul Lemoine, chef du Service de Pédiatrie de l'hôpital universitaire de Nantes,

¹³⁷Nicloux, 1900, thèse publiée

identifie quelques années plus tard, une dysmorphie faciale chez des enfants ayant été exposés à l'alcool au cours de la grossesse. Un retard de croissance et des troubles neurodéveloppementaux observés chez ces enfants ont également été rapportés par ce médecin. En 1968, il publie, dans l'indifférence générale, son étude « *les enfants de mères alcooliques, anomalies observées à propos de 127 cas* » dans la revue *Ouest Médical*. A l'époque, son travail se trouve durement rejeté par la communauté médicale, certains affirmaient alors que l'alcoolisme des parents n'avait pas d'impact sur les enfants. Cependant, en 1973 à *Seattle*, Kenneth L. Jones et David W. Smith confirmèrent le tableau clinique constaté par Paul Lemoine cinq ans plus tôt. Onze cas sont relatés par ces deux pédiatres américains dans la très prestigieuse revue *The Lancet*, c'est ce qu'il eut fallu pour que le syndrome d'alcoolisation fœtale prenne de l'ampleur et devienne une réalité médicale mondialement reconnue. Paul Lemoine, dont les travaux sont dorénavant renommés, avait donc vu ce que d'autres n'avaient pas voulu voir. Paul Lemoine poursuivit son travail sur les enfants nés de mères alcooliques non sans difficultés. L'âge de la retraite venu, il chercha à retrouver les enfants qu'il avait autrefois examinés. Il inspecta un grand nombre d'établissement hébergeant ou employant des personnes handicapées et les organismes chargés de les placer, soit pas moins d'une centaine. Son travail de recherche a néanmoins été entravé par des organismes retranchés derrière le secret médical, refusant de lui révéler le diagnostic qu'il avait pourtant lui-même posé vingt ans plus tôt. Des années plus tard, il finit par retrouver deux tiers des individus qu'il avait diagnostiqués. L'examen de ces individus fera l'objet en 1992 d'une deuxième publication « *Avenir des enfants nés de mères alcooliques (étude de 105 cas retrouvés à l'âge adulte) et quelques constatations d'intérêt prophylactique* ». Fait intéressant, mais inquiétant, Paul Lemoine a également retrouvé dans ces établissements quatorze adultes descendants de mères alcooliques qui avaient été considérés à la naissance comme « normaux » car sans dysmorphie faciale.

4.1.3. Ensemble des troubles causés par l'alcoolisation fœtale

Depuis que le syndrome d'alcoolisation fœtale a été défini, les chercheurs se sont davantage intéressés au lien qui peut exister entre l'exposition prénatale à l'alcool et une panoplie de déficiences développementales physiques, cognitives et comportementales chez l'enfant. Ces déficiences ont depuis peu été regroupées sous le terme des troubles causés par l'alcoolisation fœtale (TCAF ; **Figure 22**). Les TCAF regroupent le SAF dans sa forme complète et partielle et les troubles neurodéveloppementaux liés à l'alcool (TDNLA). Dans le cas de figure où il existe chez un individu une atteinte de la croissance staturo-pondérale, de l'anatomie

fonctionnelle cérébrale et de la morphologie faciale, la spécificité symptomatique est suffisamment forte pour que le diagnostic de SAF puisse être retenu. L'absence du retard de croissance autorise toutefois à valider un diagnostic de SAF (qui sera qualifié de partiel), à condition que l'atteinte fonctionnelle cérébrale soit sévère et la dysmorphie faciale nette [138]. Sans preuve d'exposition prénatale à l'alcool, le diagnostic de SAF est posé qu'en cas de dysmorphie complète [139].

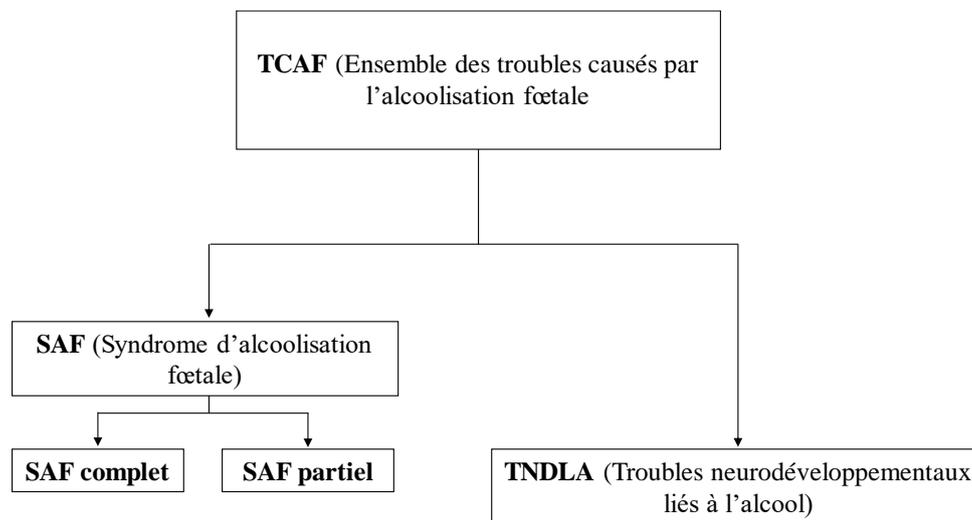


Figure 22 : Ensemble des troubles causés par l'alcoolisation fœtale. Les TCAF incluent le SAF (dans sa forme complète et partielle) et les troubles neurodéveloppementaux liés à l'alcool (TNDLA). Le SAF représente l'atteinte la plus sévère d'une exposition prénatale à l'alcool et se traduit chez l'enfant par une dysmorphie cranio-faciale, un retard de croissance pré et postnatal et des manifestations d'atteinte du système nerveux central. Toutefois, certains enfants exposés *in utero* à l'alcool ne présentent aucune caractéristique faciale dysmorphique mais manifestent une atteinte du système nerveux central. Pour ces enfants, on parle de TNDLA. D'après Chudley *et al.*, 2005 [140].

Selon les estimations d'une enquête réalisée par l'Inserm, 1 à 3 enfants pour 1000 naissances vivantes en France sont touchés par le SAF. En tenant compte des ETCAF, la prévalence est rapportée à 1 enfant pour 100 naissances vivantes [138]. D'un point de vue financier, le coût sociétal du handicap lié à l'alcoolisation fœtale n'a été que très peu étudié en France. A ce jour, seule une étude dans laquelle ont été comptabilisées les prises en charge médicale, sociale, éducative, et familiale a été réalisée. Cette étude menée au Havre rapporte un coût individuel, de la naissance jusqu'à l'âge de 20 ans, de 520 000 euros pour la forme la plus sévère [141].

¹³⁸Germanaud et Toutain, 2017, *Contraste*

¹³⁹Astley, 2006, *Pediatrics*

¹⁴⁰Chudley *et al.*, 2005, *Journal de l'Association Médicale Canadienne*

¹⁴¹Guyet, 2009, *Thèse*

Sur le plan mondial, 10% des femmes consomment de l'alcool au cours de la grossesse (**Figure 23**). Parmi ces femmes, 1 sur 67 mettra au monde un enfant SAF [142]. Malgré les efforts de prévention primaire déployés dans de nombreux pays par les organismes de santé publique pour éliminer la consommation de boisson alcoolisée durant la grossesse, un grand nombre de femme enceinte continue de boire de l'alcool, rappelant ainsi que, bien que nécessaire, la prévention primaire doit être complétée par une amélioration du diagnostic et de la prise en charge des enfants [143 ; (**Figure 23**)].

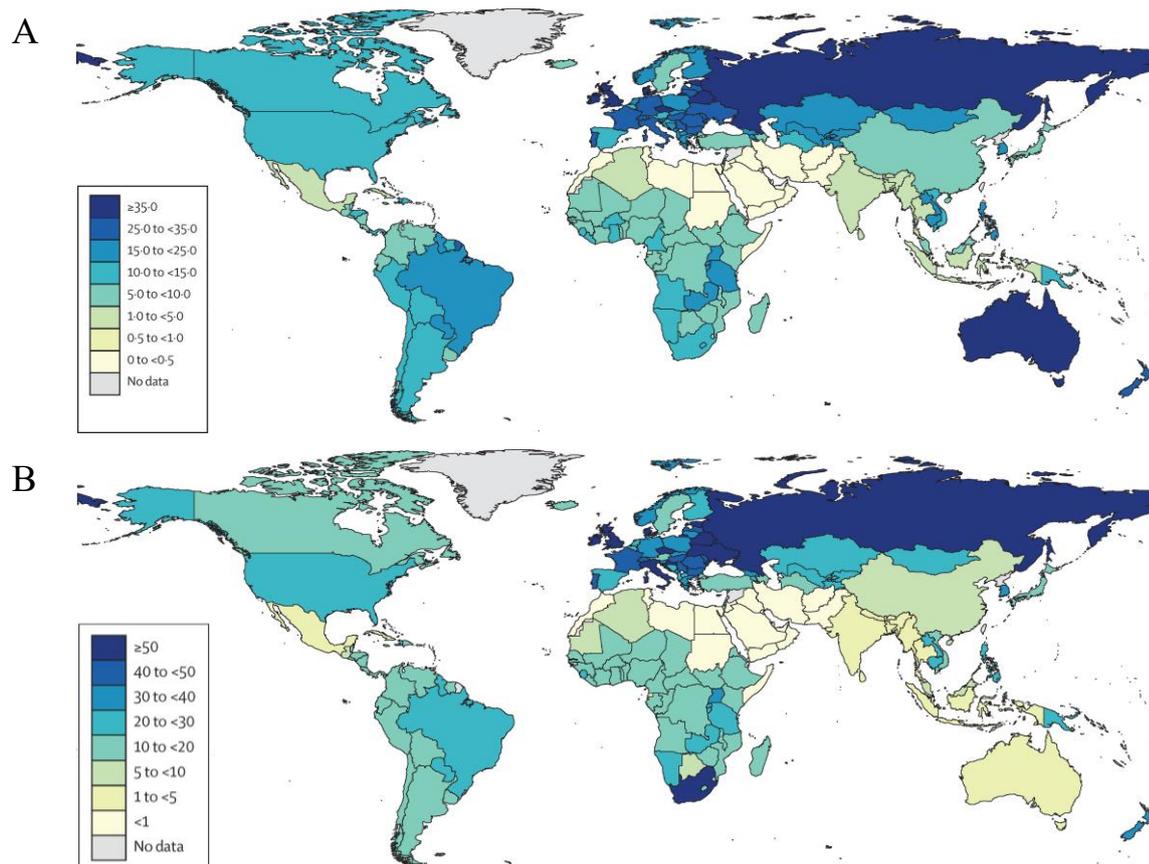


Figure 23 : Prévalence globale parmi la population générale de la consommation d'alcool au cours de la grossesse et de SAF en 2012. (A) Prévalence globale (%) parmi la population générale de la consommation d'alcool au cours de la grossesse en 2012. Les cinq pays avec la prévalence estimée la plus haute sont la Russie, le Royaume-Uni, le Danemark, la Biélorussie et l'Irlande. Les cinq pays avec la prévalence la plus faible sont le sultanat d'Oman, les Emirats Arabes Unis, l'Arabie Saoudite, la Qatar et le Koweït. **(B)** Prévalence globale (pour 10 000 personnes) parmi la population générale de SAF en 2012. Les cinq pays avec la prévalence la plus haute de SAF pour 10 000 personnes sont la Biélorussie, l'Italie, l'Irlande, la Croatie et l'Afrique. Les cinq pays avec la prévalence la plus faible sont le sultanat d'Oman, les Emirats Arabes Unis, l'Arabie Saoudite, le Qatar et le Koweït. D'après Popova *et al.*, 2017 [142].

¹⁴²Popova *et al.*, 2017, The Lancet Global Health

¹⁴³World Health Organization, 2018

4.2. Influence de l'alcool sur le développement cérébral

4.2.1. Physiopathologie de l'exposition prénatale à l'alcool

L'alcool ingéré est rapidement distribué dans l'ensemble de l'organisme. Une fois absorbé, la détoxification hépatique débute avec l'oxydation de la molécule d'éthanol en acétaldéhyde (**Figure 24**). L'éthanol et son produit de dégradation, qui est tout aussi toxique, franchissent très facilement la barrière placentaire et diffusent dans le liquide amniotique. L'alcoolémie du fœtus sera donc identique, voire supérieure à celle de la mère [130]. En effet, du fait de son immaturité hépatique, le fœtus n'est que très peu capable de métaboliser l'éthanol. L'élimination de l'alcool est longue et difficile chez le fœtus en raison de la faible activité de l'enzyme de dégradation (ADH : alcool déshydrogénase) et de la possible déglutition du liquide amniotique qui constitue un véritable réservoir d'alcool [144].

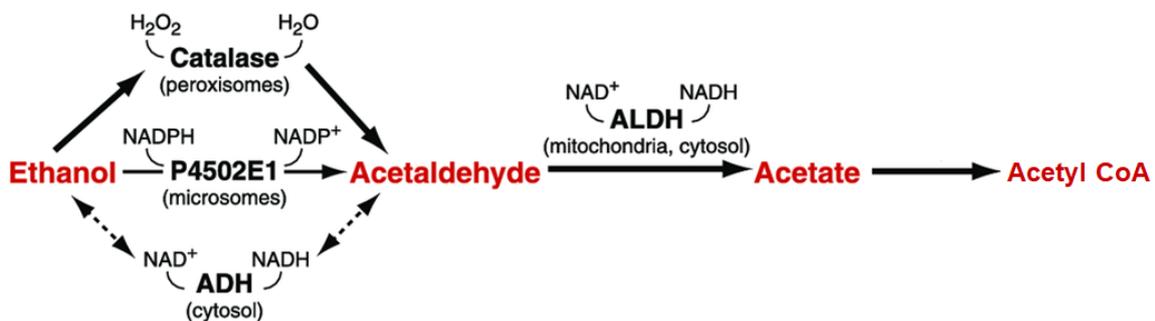


Figure 24 : Voies de dégradation de l'éthanol dans le foie. L'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde se fait suivant trois voies enzymatiques distinctes : la voie de l'alcool déshydrogénase (ADH) qui est cytosolique, la voie du système microsomal d'oxydation de l'éthanol (MEOS) qui fait intervenir le cytochrome P4502E1 dans le réticulum endoplasmique et la voie de la catalase, localisée dans les peroxysomes. Cette dernière semble peu importante en raison de l'eau oxygénée nécessaire à la réaction dont la présence est limitée dans l'organisme. L'acétaldéhyde est ensuite métabolisé en acétate par l'acétaldéhyde déshydrogénase (ALDH), localisée dans la mitochondrie et le cytosol. La majeure partie de l'acétate produite est diffusée dans l'organisme, la partie restante dans le foie va subir une dernière réaction qui formera de l'acétyl CoA. L'acétyl CoA entre dans le cycle de Krebs et produit de l'énergie, du dioxyde de carbone et de l'eau. ADH : alcool déshydrogénase ; ALDH : acétaldéhyde déshydrogénase ; H₂O : eau ; H₂O₂ : eau oxygénée ; NAD⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide ; NADH : hydrure de NAD ; NADP⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ; NADPH : hydrure de NADP. Modifiée d'après Deitrich *et al.*, 2006 [145].

¹⁴⁴Burd *et al.*, 2012, Journal of Perinatology

¹⁴⁵Deitrich *et al.*, 2006, Alcohol Research & Health

4.2.2. Sensibilité du cerveau en cours de développement

Le développement et la maturation du cerveau se produit tout au long de la gestation et se poursuit après la naissance. Or, l'éthanol franchit la barrière hémato-encéphalique aussi facilement qu'il traverse la barrière placentaire [146, 147]. Au même titre que les autres organes, le cerveau du fœtus est donc susceptible de voir son développement perturbé par l'éthanol. La consommation d'alcool pendant la grossesse, quel que soit le moment, est donc néfaste pour l'enfant à naître [138 ; (Figure 25)]. En matière de santé, le doute ne doit pas profiter à l'accusé. La communauté scientifique s'accorde en effet à dire qu'il n'existe pas de seuil de consommation qui ne soit pas délétère pour le fœtus, et prône le principe de précaution qui consiste à proscrire toute consommation d'alcool chez la femme dès le début de la grossesse et pendant toute sa durée [148].

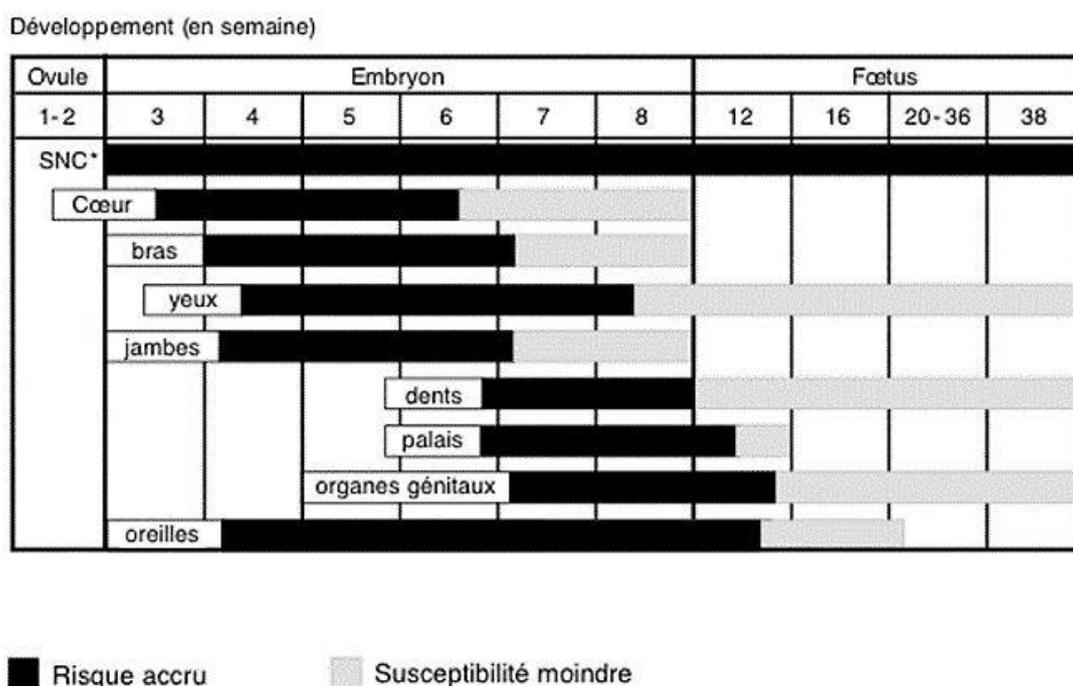


Figure 25 : Représentation des risques d'une exposition prénatale à l'alcool en fonction des périodes de développement des différents organes. Quelle que soit la période au cours de laquelle il a été consommé, l'alcool représente une menace pour le bon développement du cerveau, et en particulier du système nerveux central. SNC : Système nerveux central. D'après enquête expertise Inserm, 2001 [149].

¹⁴⁶Lipinski *et al.*, 2001, Advanced Drug Delivery Reviews

¹⁴⁷Wong *et al.*, 2013, Frontiers in Neuroengineering

¹⁴⁸Société Française d'alcoologie, 2001, Alcoologie et Addictologie

¹⁴⁹Expertise collective Inserm, 2001, rapport

4.2.3. Impact d'une exposition prénatale à l'alcool sur la neurogenèse et l'angiogenèse cérébrale

La phase d'organogenèse, qui se produit en grande majorité au cours de la période embryonnaire, permet l'apparition de la plaque neurale, ébauche du système nerveux. Dès la fin de la 4^{ème} semaine du développement embryonnaire, la plaque neurale laisse place à une nouvelle structure : le tube neural qui, dans sa partie antérieure, donnera naissance au cerveau. Consommer de l'alcool au cours de cette phase peut entraîner la destruction par apoptose des cellules de la crête neurale et ainsi générer les malformations cranio-faciales qui caractérisent le syndrome d'alcoolisation fœtale (**Figure 26**).

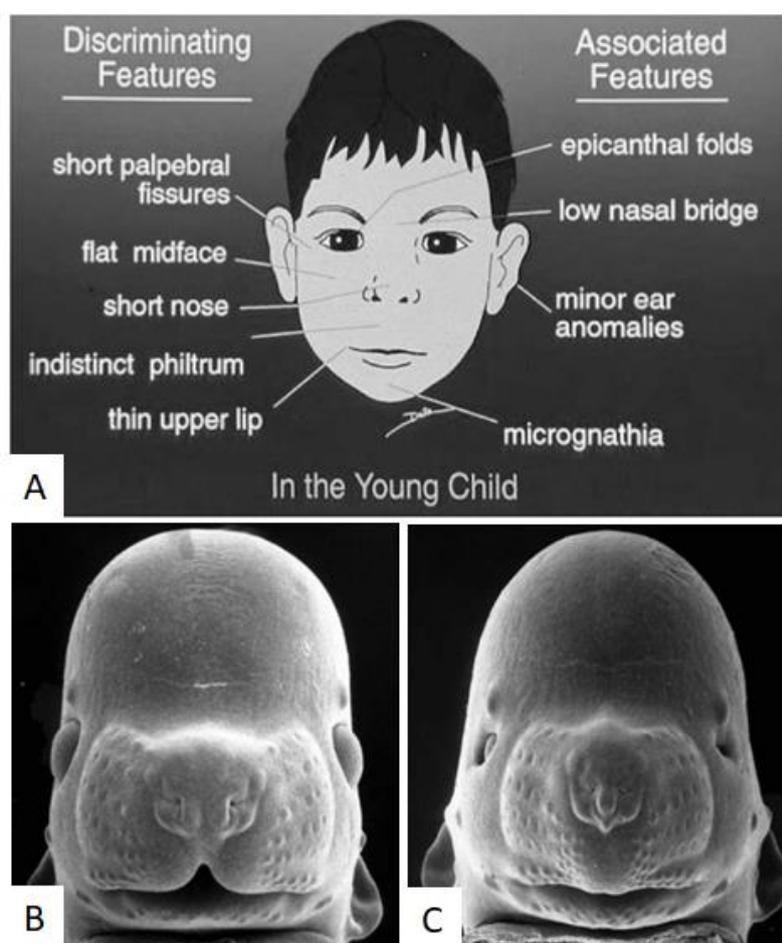


Figure 26 : Illustration des effets d'une exposition prénatale à l'alcool sur la face chez l'Homme et chez la Souris. (A) Représentation illustrée des anomalies faciales décrites chez les enfants présentant un syndrome d'alcoolisation fœtale. **(B)** Photographie d'un fœtus de souris non exposé à l'alcool *in utero* et **(C)** d'un fœtus de souris exposé à l'alcool *in utero*. Ce dernier présente une hypoplasie de la mandibule inférieure, un sillon médian absent au niveau du museau, et une microphthalmie. D'après Clarke et Gibbard, 2001 [150]; Sulik, 2005 [151].

¹⁵⁰Clarke et Gibbard, 2003, The Canadian Child and Adolescent Psychiatry Review

¹⁵¹Sulik, 2005, Experimental Biology and Medicine

L'explication de ce phénomène réside dans la disponibilité en acide rétinoïque au cours des phases précoces de l'embryogenèse. En présence d'alcool, la quantité de cet élément essentiel diminue. L'alcool détournerait, pour sa propre dégradation, la rétinaldéhyde déshydrogénase 2, une enzyme permettant la production par l'embryon d'acide rétinoïque à partir du rétinol (aussi appelé vitamine A ; [152] ; [153]). Faisant suite à la phase d'organogenèse, la phase de différenciation des différentes aires cérébrales résulte en la prolifération des cellules neuronales dans le cerveau primitif puis en la migration de ces cellules vers la périphérie et en particulier vers le cortex cérébral. Selon le type cellulaire, cette migration est guidée par les cellules de la glie radiaire ou par les microvaisseaux cérébraux. S'ensuit une phase de croissance cérébrale intense au cours de laquelle la taille du cerveau va augmenter de façon importante en raison du développement des arborisations dendritiques et des synapses, de la prolifération des astrocytes et des oligodendrocytes. Une exposition à l'alcool est donc susceptible de perturber la migration et la prolifération des cellules neuronales [154, 155], d'augmenter la mortalité apoptotique [156, 157], d'affecter la gliogenèse [158], la maturation des oligodendrocytes [159] et l'angiogenèse cérébrale [160]. Les conséquences de l'alcool sur le développement du système nerveux central embryonnaire et foetal ne sont pas uniformes compte tenu de l'existence d'une vulnérabilité régionale sélectivité. Le cortex cérébral, l'hippocampe et le cervelet manifestent, en effet, une sensibilité accrue vis-à-vis de l'alcool [161, 162]. Notons qu'environ un SAF complet sur dix présente une agénésie totale ou partielle du corps calleux [163]. Même si plusieurs travaux réalisés chez l'adulte mettent en évidence des effets de l'alcool sur le système vasculaire, son action sur l'angiogenèse au cours du développement cérébral reste à ce jour peu étudiée. Les données d'une étude menée chez le primate non humain indiquent que la consommation d'alcool réduit la formation des capillaires vasculaires [164]. De plus, il a été montré *in vitro* que l'alcool altère la signalisation du VEGF-A dans une lignée de cellules endothéliales [165].

¹⁵²Deltour *et al.*, **1996**, Federation of American Societies for Experimental Biology Journal

¹⁵³Shabtai *et al.*, **2018**, Scientific reports

¹⁵⁴El Fatimy *et al.*, **2014**, EMBO Molecular Medicine

¹⁵⁵Luo et Miller, **1998**, Brain Research Reviews

¹⁵⁶Ikonomidou *et al.*, **2000**, Science

¹⁵⁷Naseer *et al.*, **2014**, Neurological Sciences

¹⁵⁸Manzo-Avalos et Saavedra-Molina, **2010**, International Journal of environmental Research and Public Health

¹⁵⁹Coutts et Harrison, **2015**, Alcoholism, Clinical and Experimental Research

¹⁶⁰Jégou *et al.*, **2012**, Annals of Neurology

¹⁶¹Miller, **1993**, Alcoholism: Clinical and Experimental Research

¹⁶²Sowell *et al.*, **1996**, Alcoholism: Clinical and Experimental Research

¹⁶³Lebel *et al.*, **2011**, Neuropsychology Review

¹⁶⁴Williams *et al.*, **2008**, Alcoholism : Clinical and Experimental Research

¹⁶⁵Radek *et al.*, **2008**, American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology

Au cours du neurodéveloppement, l'exposition quotidienne de souris gestantes à l'alcool se traduit, chez le souriceau âgé de deux jours, par une réduction significative de l'expression corticale du VEGF-R2. Ces travaux, réalisés au sein du Laboratoire, ont également démontré une diminution de la densité vasculaire corticale et une perte de l'orientation radiale des microvaisseaux chez les souriceaux [160]. Plus récemment, les travaux d'une étude menée au Laboratoire ont révélé qu'une répression placentaire du PlGF chez la Souris était responsable d'anomalies de l'angiogenèse cérébrale chez le fœtus, comparables à celles retrouvées chez l'Homme suite à une alcoolisation *in utero* [67 ; brevet FR1555727].

4.2.4. Cibles cellulaires et moléculaires des effets cérébraux de l'alcool

En raison de ses propriétés pharmacologiques, l'éthanol passe facilement la barrière hémato-encéphalique et peut donc atteindre le cerveau du fœtus rapidement [166]. Au niveau cellulaire, l'éthanol est toxique et agit sur de nombreux processus. Cette molécule peut, en effet, perturber la migration et la prolifération neuronale [154, 155], accroître la mort cellulaire par apoptose [156, 157], affecter la gliogenèse des astrocytes [158], ou encore la maturation des oligodendrocytes [159]. Au niveau moléculaire, l'éthanol interagit étroitement avec les systèmes de neurotransmission, et en particulier, avec le système excitateur glutamatergique [167] et avec le système inhibiteur GABAergique [168]. Concernant le récepteur NMDA, l'éthanol aura des effets variables en fonction du mode de consommation considéré. Aussi, une consommation aiguë d'alcool aura pour effet d'inhiber la conductance cationique du récepteur NMDA alors qu'une consommation chronique d'alcool aura pour effet d'augmenter la transmission glutamatergique [169]. Chez le Rat, une exposition modérée à l'alcool, durant une période correspondant chez la femme au troisième trimestre de grossesse, accroît la proportion de récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B [170]. Hormis le système glutamatergique, il a également été établi que l'éthanol pouvait perturber le système GABAergique. En effet, dans le cas d'une exposition faible à l'alcool au cours des deux premiers trimestres de la grossesse, la migration des interneurons GABA est augmentée dans le cortex [171].

¹⁶⁶Deitrich *et al.*, 1989, Pharmacological Reviews

¹⁶⁷El Fatimy *et al.*, 2014, EMBO Molecular Medicine

¹⁶⁸Nevo et Hamon, 1995, Neurochemistry International

¹⁶⁹Zorumski *et al.*, 2014, Alcohol

¹⁷⁰Farley et Mihic, 2015, Brain Research

¹⁷¹Bird *et al.*, 2015, PLoS One

Par ailleurs, l'éthanol interagit aussi avec les systèmes dopaminergique, sérotoninergique et cannabinoïdes [172, 173, 174]. De plus, de nombreuses études ont montré qu'une exposition prénatale à l'alcool pouvait affecter les processus épigénétiques [175, 176]. En effet, une alcoolisation pré- ou périnatale impacte durablement l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le neurodéveloppement en altérant la méthylation de l'ADN [175]. Néanmoins, à ce jour, la très grande part des études portant sur les effets de l'alcoolisation sur le développement cérébral a abordé la problématique sous l'angle des interactions de l'alcool avec les cellules nerveuses. Ce n'est que récemment que l'impact de l'alcool sur la dysfonction endothéliale cérébrale a fait l'objet d'études [67, 177, 178] ouvrant de nouvelles perspectives en termes de diagnostic et de prise en charge des TCAF.

¹⁷²Cuzon *et al.*, **2008**, The Journal of Neuroscience

¹⁷³Buske et Gerlai, **2011**, Neurotoxicology and Teratology

¹⁷⁴Fernandes *et al.*, **2015**, The International Journal of Neuropsychopharmacology

¹⁷⁵Ceccarini *et al.*, **2014**, The Journal of Neuroscience

¹⁷⁶Resendiz *et al.*, **2013**, Epigenomics

¹⁷⁷Subbanna *et al.*, **2015**, The International Journal of Neuropsychopharmacology

¹⁷⁸Solonskii *et al.*, **2008**, Neurosciences and Neurobehavioral Physiology

Chapitre 2

Hypothèse et Objectifs

Le SAF est causé par la consommation d'alcool pendant la grossesse. L'expression la plus sévère des troubles causés par l'alcoolisation fœtale (TCAF) se manifeste chez l'enfant par une triade de déficiences à la fois physique, cognitive et comportementale. Ces déficiences forment un *continuum* de troubles du développement connus sous le nom d'ensemble des troubles causés par l'alcoolisation fœtale. Une enquête expertise Inserm a estimé qu'un à trois enfants pour mille naissances vivantes en France sont touchés par le SAF. En prenant en compte l'ensemble des TCAF, la prévalence est ramenée à un enfant pour cent naissances vivantes.

Les traits dysmorphiques associés au SAF sont caractéristiques et permettent de diagnostiquer, soit à la naissance, soit *in utero* par échographie, les enfants qui ont été exposés à l'alcool au cours de la grossesse. Toutefois, ces atteintes anatomiques ne sont pas présentes chez la plupart des enfants exposés *in utero* à l'alcool. Pour ces enfants, les troubles neurologiques ne seront décelés que bien plus tard avec la scolarisation. L'identification précoce des enfants TCAF permettrait d'envisager un accompagnement adapté dès le plus jeune âge, à une période de vie où le potentiel de récupération est important. Afin d'identifier dès la naissance les enfants à risque de développer des troubles neurologiques, le Laboratoire a mis en place un programme translationnel d'identification de biomarqueurs d'atteintes cérébrales suite à une alcoolisation *in utero* en ciblant des facteurs placentaires pro-angiogéniques [67, brevet FR1555727].

En condition physiologique, l'angiogenèse ne peut se réaliser sans un équilibre entre les régulateurs positifs et les régulateurs négatifs de l'angiogenèse. Aux mêmes titres que le VEGF-A et son récepteur le VEGF-R2, le PlGF est un acteur essentiel de l'angiogenèse. Contrairement au VEGF-A qui est aussi bien exprimé par le cortex cérébral que par le placenta, le PlGF est quant à lui majoritairement exprimé par le placenta, cet organe transitoire mais indispensable au maintien et au bon déroulement de la grossesse. Hormis le PlGF, il existe une autre protéine fortement exprimée par le placenta jouant un rôle important dans les processus angiogéniques, il s'agit de la protéine CD146. Le lien entre CD146 et angiogenèse a véritablement été établi en 2012 par la découverte de CD146 en tant que co-récepteur de VEGF-R2. De plus, le CD146 existe sous une forme soluble qui agit en régulant négativement la migration des trophoblastes. Plus récemment, il a été mis en évidence chez la Souris que la répression placentaire du PlGF était responsable d'une perturbation de la mise en place du réseau vasculaire cortical des fœtus, comparable à celle observée dans le cerveau fœtal humain exposé *in utero* à l'alcool. Compte tenu de ces éléments, l'hypothèse d'une implication de la forme soluble de CD146 dans les troubles angiogéniques observés dans le cerveau des souriceaux et des enfants exposés *in utero* à l'alcool a été émise.

L'objectif de mon projet de thèse visait donc à rechercher si le CD146 placentaire est impliqué dans le contrôle de l'angiogenèse cérébrale du fœtus et si l'alcoolisation *in utero* impacte les profils d'expression placentaire et cérébral du CD146, contribuant ainsi à une dysfonction de l'axe « Placenta-Cerveau ».

De plus, en perspective de mon projet de thèse, une analyse transcriptomique comparative « Placenta-Cerveau » a été initiée afin de rechercher l'impact de l'alcoolisation *in utero* sur des familles de gènes impliquées dans le contrôle de l'angiogenèse.

Chapitre 3

Résultats

Etude 1

Alcoolisation fœtale : le placenta au secours du diagnostic précoce des troubles du développement cérébral de l'enfant

Camille Sautreuil, Annie Laquerrière, Matthieu Lecuyer, Carole Brasse-Lagnel, Sylvie Jégou, Soumeiya Bekri, Pascale Marcorelles, Sophie Gil, Stéphane Marret, Bruno J. Gonzalez

Accepté dans Médecine/Sciences

Le syndrome d'alcoolisation fœtale (SAF) est l'atteinte la plus sévère des troubles causés par l'alcoolisation fœtale (TCAF). Devant la présence d'une dysmorphie craniofaciale très caractéristique, il est possible pour un clinicien d'établir un diagnostic précoce d'un enfant SAF. Cependant, la plupart des enfants TCAF échappent à un diagnostic précoce en raison de l'absence d'anomalies morphologiques évidentes. Pourtant, ces enfants ne sont pas dépourvus d'atteintes neurologiques et nombre d'entre eux seront identifiés tardivement sur la base de troubles du comportement, de l'attention ou des apprentissages, faisant perdre plusieurs années de prise en charge. Une première étude publiée en 2012 a mis en évidence qu'une exposition prénatale à l'alcool induit, chez l'Homme comme chez la Souris, une désorganisation importante de l'angiogenèse corticale de l'enfant. Des avancées récentes ont également permis d'établir l'existence d'un axe fonctionnel Placenta-Cerveau impliqué dans le contrôle de l'angiogenèse cérébrale ouvrant ainsi la voie à l'identification d'une nouvelle génération de biomarqueurs d'atteintes cérébrales induites par l'alcoolisation *in utero*. L'objectif de cette revue était de faire le point sur :

- l'intérêt et les limites des biomarqueurs d'exposition *in utero* à l'alcool actuels
- l'impact de l'exposition à l'alcool sur la fonction placentaire et l'expression de facteurs angiogéniques
- les conséquences d'une dysfonction « Placenta-Cerveau » sur l'angiogenèse cérébrale fœtale et l'intérêt en terme d'identification de biomarqueurs.

Alcoolisation fœtale : le placenta au secours du diagnostic précoce des troubles du développement cérébral de l'enfant

Fetal alcohol exposure: when placenta would help to the early diagnosis of child brain impairments

Camille Sautreuil¹, Annie Laquerrière^{1,3}, Matthieu Lecuyer¹, Carole Brasse-Lagnel¹, Sylvie Jégou¹, Soumeiya Bekri^{1,4}, Pascale Marcorelles⁵, Sophie Gil⁶, Stéphane Marret^{1,2}, Bruno J. Gonzalez¹

¹INSERM U1245, Team 4, Rouen Université, Normandie Université, Rouen, France.

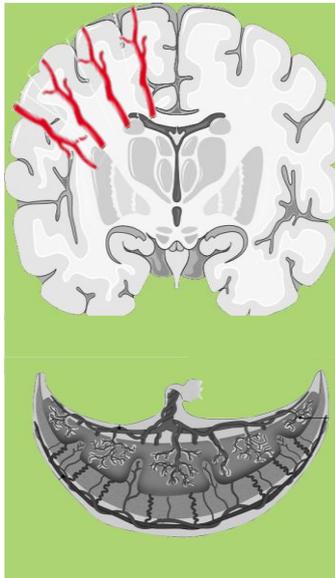
²Service de Pédiatrie Néonatale et Réanimation, Neuropédiatrie, Camsp, Hôpital Charles-Nicolle, CHU de Rouen, France.

³Service de Pathologie, Hôpital Charles-Nicolle, CHU de Rouen, France.

⁴Service de Biochimie métabolique, Hôpital Charles-Nicolle, CHU de Rouen, France.

⁵Service d'Anatomie pathologique, Hôpital Morvan, CHU de Brest, France.

⁶INSERM UMR-S1139, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Fondation PremUp, Paris, France



Résumé

La consommation d'alcool au cours de la grossesse constitue une cause majeure de troubles du comportement et de handicap. Alors qu'il est possible pour un clinicien d'établir un diagnostic néonatal du Syndrome d'Alcoolisation Fœtale, l'atteinte la plus sévère des troubles causés par l'alcoolisation fœtale (TCAF), une grande majorité des enfants va échapper à un diagnostic précoce en raison de l'absence d'anomalies morphologiques évidentes. Plusieurs années de prise en charge sont alors perdues. Des avancées récentes ont permis d'établir l'existence d'un axe fonctionnel Placenta-Cerveau impliqué dans le contrôle de l'angiogenèse cérébrale et qui se trouve dérégulé chez les enfants exposés *in utero* à l'alcool. Une angiogenèse cérébrale normale étant un prérequis à l'établissement d'un neurodéveloppement correct, ces avancées ouvrent la voie à l'identification d'une nouvelle génération de biomarqueurs placentaires d'atteinte cérébrale pour le diagnostic précoce des enfants TCAF.

Summary

Alcohol consumption during pregnancy constitutes a major cause of neurodevelopmental and behavioral disabilities. Whereas it is possible for clinicians to establish a perinatal diagnosis of fetal alcohol syndrome, the more severe expression of fetal alcohol spectrum disorder (FASD), most FASD children are late or mis-diagnosed due to a lack of clear morphological and neurodevelopmental abnormalities. Several precious years of care are consequently lost. Recent data revealed a functional placenta-brain axis involved in the control of the fetal brain angiogenesis which is impaired by *in utero* alcohol exposure. Because in the developing fetal brain a correct angiogenesis is required for a correct neurodevelopment, these preclinical and clinical advances pave the way of a new generation of placental biomarkers for early diagnosis of FASD.

Le diagnostic précoce des Troubles Causés par l'Alcoolisation Fœtale, un enjeu pour les cliniciens

La consommation d'alcool au cours de la grossesse constitue une cause majeure de trouble du neurodéveloppement/comportement et de handicap secondaire. Les dernières données épidémiologiques mondiales indiquent que, malgré une prévention primaire active dans certains pays, la part des femmes consommant de l'alcool pendant leur grossesse et la prévalence des Troubles Causés par l'Alcoolisation Fœtale (TCAF) sont en augmentation [1, 2]. Il est possible pour un clinicien d'établir un diagnostic néonatal du Syndrome d'Alcoolisation Fœtale (SAF), l'atteinte la plus sévère des TCAF, devant l'observation d'une dysmorphie faciale caractéristique, associé à un petit périmètre crânien et un faible poids de naissance, voire des malformations diversement associées atteignant le cœur, le système uro-digestif, l'os ou le système nerveux central. Une grande majorité des enfants va cependant échapper à un diagnostic précoce en raison de l'absence d'anomalies morphologiques évidentes [3, 4]. Néanmoins, ces enfants ne sont pas dépourvus d'atteintes neurologiques dont les conséquences fonctionnelles neurodéveloppementales et comportementales se révéleront progressivement avec l'âge. Ainsi, nombre de ces enfants sont identifiés tardivement au cours de leur scolarité par les équipes éducatives sur la constatation de troubles de l'attention associés à une hyperactivité majeure, des troubles des apprentissages, voire des comportements violents [4]. Ces enfants, souvent en situation d'échec scolaire, vont également présenter des difficultés d'intégration sociale qui retentiront durablement sur leur vie d'adulte [5]. Le diagnostic précoce des enfants TCAF constitue donc un défi pour les cliniciens afin de permettre une prise en charge rapide à une période où la plasticité cérébrale est maximum avant 5 ans. Plusieurs études menées notamment dans le cadre des troubles du spectre de l'autisme ont en effet montré qu'une prise en charge éducative précoce et intensive est associée à un meilleur pronostic neurodéveloppemental et comportemental, notamment dans les domaines du langage et du comportement [6, 7].

Biomarqueurs d'exposition : intérêts et limites

En cas d'alcoolisation fœtale, les biomarqueurs existants (Table 1) visent à rechercher une exposition à l'alcool et à répondre aux questions suivantes : la mère a-t-elle consommé de l'alcool durant la grossesse ou l'enfant a-t-il été exposé *in utero* à l'alcool ? Ainsi, le dépistage d'une consommation d'alcool va se faire au mieux chez la femme lors de la consultation préconceptionnelle par l'équipe de santé (médecin généraliste, sage-femme...), grâce à

l'utilisation de questionnaires ou au dosage chez la femme et/ou l'enfant des métabolites de l'éthanol ou de molécules dérégulées par la consommation d'alcool (Table 1) [8, 9]. Néanmoins, tous les enfants exposés *in utero* à l'alcool ne développeront pas nécessairement des troubles alors qu'une exposition même modérée ou ponctuelle peut entraîner une déviation de la trajectoire neurodéveloppementale normale de l'enfant. On aborde ainsi toute la complexité de la toxicité de l'alcool pour laquelle il n'existe pas de dose seuil établie et dont les effets vont s'exprimer différemment en fonction du stade de développement du fœtus, du degré de maturation cérébrale et des polymorphismes génétiques. Cette notion de fenêtre de vulnérabilité [10, 11] va d'ailleurs au-delà de la période fœtale avec des modifications épigénétiques pouvant impacter à long terme l'activité cérébrale et le comportement de l'individu [12, 13]. Ainsi, bien que nécessaires, les biomarqueurs d'exposition ne permettent pas d'établir un diagnostic à court terme chez la plupart des enfants TCAF.

Le placenta, un organe mixte source de facteurs pro-angiogéniques

Le placenta humain est un organe autonome et transitoire dont les multiples fonctions endocrines et immunomodulatrices permettent le développement du fœtus. Il constitue une interface entre le fœtus et l'endomètre décidualisé qui assure à la fois un rôle de barrière et d'échanges essentiels à la croissance fœtale [14]. La villosité chorale flottante forme l'unité structurale et fonctionnelle du placenta humain (Figure 1A). Elle se compose d'un axe mésenchymateux incluant des capillaires fœtaux et des macrophages appelés « cellules de Hofbauer » [14]. Elle est bordée d'une assise de cytotrophoblastes villeux qui en fusionnant, forme une seconde couche multinucléée et polarisée, le syncytiotrophoblaste. Les circulations maternelle et fœtale sont séparées par ces deux assises cellulaires constituant la villosité flottante. Le syncytiotrophoblaste possède une membrane apicale bordée de nombreuses microvillosités qui se projettent dans la chambre intervillieuse. Il est en contact direct avec le sang maternel et donc la zone d'échange privilégiée des échanges foeto-maternels. Il assure ainsi des fonctions métaboliques, endocrines et de tolérance immunitaire [14]. Ainsi, des hormones peptidiques telles que l'hormone de croissance placentaire (PGH) ou l'hormone lactogène placentaire (hPL) peuvent être sécrétées et vont contribuer à la croissance fœtale [15]. Des facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF_A sont également synthétisés par le placenta et, en particulier, le Placental Growth Factor ou PlGF, un membre de la famille du VEGF_A, qui est très fortement exprimé par différents types cellulaires tels que les trophoblastes villeux, extravilleux, le syncytiotrophoblaste et les cellules endothéliales fœtales, suggérant une

régulation autocrine de l'angiogenèse ; il est de plus secrété par cet organe (Figure 1B) [16, 17]. Alors que les études de transcriptomique ou de protéomique indiquent que le PlGF est peu exprimé dans le système nerveux central (Figure 2A, B), son unique récepteur, le VEGFR1/Flt-1 est, quant à lui, présent au niveau cérébral [18] et existe également sous une forme circulante (sFlt-1 ; Figure 1B) [19]. Sur la base de ces éléments, la contribution de facteurs pro-angiogéniques d'origine placentaire dans le contrôle de l'angiogenèse cérébrale de l'enfant est devenue une hypothèse plausible.

Alcoolisation fœtale et anomalies de l'angiogenèse placentaire

Chez l'individu adulte, plusieurs études ont établi des liens entre l'exposition à l'alcool et des anomalies de l'angiogenèse. Chez l'Homme, l'alcoolisme perturbe le processus de cicatrisation en altérant les réponses angiogéniques et inflammatoires [20] alors que chez le primate non humain, la consommation d'éthanol réduit la capacité des précurseurs endothéliaux à générer de nouveaux capillaires [21]. Chez le rongeur, des études menées *in vivo* et *in vitro* ont révélé que l'éthanol contrecarre les effets pro-angiogéniques du VEGF_A et perturbe notamment l'expression du récepteur VEGFR2/Flk-1 [22-24].

Au cours de la grossesse, il est connu de longue date que la consommation d'alcool altère le développement et le fonctionnement placentaire [25, 26]. Ainsi, il a été mis en évidence une diminution du poids du placenta [27], une perturbation des sécrétions hormonales [28] ainsi qu'un puissant effet vasoconstricteur [29]. Toutefois, alors que plusieurs de ces processus soutendent une atteinte vasculaire, ce n'est que récemment que l'impact de l'alcool sur l'angiogenèse du placenta humain a été précisé d'un point de vue moléculaire et cellulaire [30]. Ainsi, l'étude comparée de 42 placentas exposés à l'alcool *versus* 41 placentas témoins sur une période allant de 21 à 42 semaines gestationnelles indique que la 30^{ème} semaine gestationnelle constitue une période charnière. En effet, alors qu'avant cet âge gestationnel, l'alcool ne modifie ni la densité des villosités ni la morphologie vasculaire, à partir de la 30^{ème} semaine jusqu'à terme, les placentas exposés à l'alcool présentent une réduction importante de la surface luminale vasculaire qui s'amplifie avec l'âge gestationnel (Figure 1C) [30]. Cette anomalie développementale est associée à une diminution de l'expression de protéines impliquées dans les jonctions serrées telles que ZO-1, et de membres de la famille du VEGF : le PlGF et le VEGF_A. Ces données obtenues chez l'Homme où l'alcoolisation est majoritairement associée à une poly-intoxication (tabac, cannabis...) ont été confirmées chez le rongeur par l'utilisation de différents modèles de monointoxication à l'éthanol et par différentes approches qu'elles

soient de nature transcriptomique [31], protéomique [32], histologique [33] ou mécanistique [30, 34] renforçant ainsi l'hypothèse d'un lien direct entre l'alcoolisation *in utero*, la dysfonction placentaire et les troubles de l'angiogenèse.

Alcoolisation fœtale et anomalies de l'angiogenèse cérébrale

Au cours du développement, le système nerveux central acquiert sa vascularisation par angiogenèse, un processus physiologique défini comme la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants [35]. Les mécanismes moléculaires de l'angiogenèse sont complexes et mettent en jeu plusieurs familles de protéines telles que les systèmes VEGFs/VEGFR, Dlls/Notch, FGFs/FGFR, Angiopoïétines/Tie ou encore PDGFs/PDGFR [36]. Ils impliquent également des protéases de la matrice extracellulaire telles que les MMPs [37] ou encore des protéines d'adhésion telles que les sélectines ou les intégrines [38]. Toutefois, bien que de très nombreuses études se soient intéressées aux effets de l'alcoolisation *in utero* sur les processus de neurogenèse, de gliogenèse, de différenciation ou de survie cellulaire [39], ce n'est que plus récemment que certains groupes de recherche ont exploré la contribution possible d'une composante endothéliale dans les atteintes cérébrales décrites chez les enfants exposés *in utero* à l'alcool [30, 40, 41]. Ainsi, en 2012, une première étude révélait chez l'Homme et la Souris qu'une exposition prénatale à l'alcool induisait au niveau cérébral une désorganisation importante des microvaisseaux corticaux se traduisant, en particulier, par la perte de leur orientation radiale (Figure 1D, E) [40]. Cette anomalie de l'angiogenèse cérébrale était associée à une diminution importante de l'expression du récepteur Flt-1. Ainsi, la dérégulation de l'expression placentaire du PlGF, d'une part, et les anomalies corticales de l'angiogenèse cérébrale et du Flt-1 observées dans le cerveau fœtal, d'autre part, laissent suspecter l'existence d'un axe fonctionnel « Placenta-Cerveau » impliqué dans le contrôle de l'angiogenèse cérébrale et pouvant être dérégulé chez les enfants exposés *in utero* à l'alcool.

Facteurs placentaires et angiogenèse cérébrale fœtale

Bien qu'il soit évident qu'une dysfonction placentaire puisse retentir sur le développement fœtal compte tenu du rôle d'échange de cet organe, la démonstration d'une contribution placentaire dans le développement cérébral de l'enfant à naître était moins bien établie. Dans un contexte d'alcoolisation fœtale, il a récemment été mis en évidence que la méthylation de l'ADN et les conséquences sur l'expression génique placentaire peuvent se traduire par des atteintes du développement neurologique, comportemental et/ou staturo-pondéral de l'enfant [42, 43]. De

même, les travaux du groupe de Weinberg montrent l'existence d'une altération des taux de glucocorticoïdes placentaires corrélée à ceux des glucocorticoïdes cérébraux au cours d'une exposition *in utero* à l'alcool [44]. Concernant l'angiogenèse, les anomalies vasculaires observées suite à une alcoolisation *in utero* aux niveaux du placenta et du cortex cérébral pouvaient être le fruit de processus concomitants mais indépendants. Toutefois, les constatations que, chez la Souris, du PlGF circulant soit retrouvé dans le sang céphalique fœtal [30], que chez l'Homme, des taux réduits de PlGF circulant au sang de cordon soient associés à des petits poids de naissance [45], et que le placenta soit une source majeure de PlGF au cours de la grossesse [46] ont renforcé l'hypothèse d'une contribution placentaire dans le contrôle de l'angiogenèse cérébrale fœtale. Le premier argument en faveur d'un axe Placenta/Cerveau impliqué dans le contrôle de l'angiogenèse a été apporté chez l'Homme par la démonstration d'une corrélation marquée entre les anomalies vasculaires placentaires et la désorganisation des microvaisseaux corticaux de fœtus exposés *in utero* à l'alcool (Figure 1F) [30]. En d'autres termes, plus la vascularisation placentaire est affectée par l'alcoolisation, plus la désorganisation des vaisseaux corticaux est importante. Chez le rongeur, l'existence d'un axe fonctionnel a été démontrée par des approches moléculaires et mécanistiques ciblant le PlGF placentaire [30]. Ainsi, la répression de l'expression placentaire du PlGF par une stratégie ARN interférence couplée à l'électroporation placentaire *in utero* entraîne une désorganisation importante des vaisseaux intra-corticaux fœtaux (Figure 1G). Il apparaît donc qu'une dysfonction placentaire ciblant le PlGF mime les anomalies corticales de l'angiogenèse cérébrale induites par une alcoolisation *in utero*. Réciproquement, des expériences dites de *rescue* ont mis en évidence que la surexpression du gène *pgf* au niveau placentaire par une stratégie Crispr/Cas9 SAM (*synergic activation mediator*) corrige au moins en partie les anomalies de l'angiogenèse corticale induites par l'alcool [30]. Enfin, en accord avec ces résultats, les travaux collaboratifs des groupes de Barbara Croy au Canada et de Peter Carmeliet en Belgique indiquent que l'inactivation non conditionnelle du gène *pgf* se traduit par une désorganisation des microvaisseaux corticaux [47] et de la rétine [48].

Le placenta, une source de biomarqueurs des troubles du développement cérébral fœtal ?

L'éthanol passe aisément les barrières placentaire et cérébrale et, de fait, au cours de la grossesse l'éthanol est en mesure d'atteindre rapidement le cerveau du fœtus [49]. Il peut ainsi interagir directement avec de nombreux types cellulaires, voies de signalisation et autres récepteurs tels que les récepteurs NMDA du glutamate [50] ou du GABA [51]. Ces propriétés

pharmacocinétiques de l'éthanol ont fortement contribué à ce que la très grande majorité des études portant sur la toxicité de l'alcool au niveau cérébral se soit focalisée sur les cellules nerveuses [39]. Toutefois, la caractérisation chez l'Homme d'effets de l'alcool sur l'angiogenèse cérébrale [40] et la mise en évidence d'une dysfonction Placenta/Cerveau impliquée dans les troubles de l'angiogenèse cérébrale [30] a ouvert de nouvelles perspectives en terme de diagnostic et de prise en charge précoce des enfants TCAF. Plusieurs études récentes démontrent que certaines populations nerveuses telles que les oligodendrocytes [52] et les interneurons GABAergiques corticaux [53] utilisent les microvaisseaux cérébraux comme guides pendant leur phase de migration. Il est donc plausible que le positionnement correct de ces populations nerveuses requiert au préalable un positionnement correct des microvaisseaux. Face à la limite diagnostique des biomarqueurs dits d'*exposition à l'alcool*, plusieurs groupes de recherche ont donc mis en place de nouvelles stratégies de recherche ciblant l'identification de biomarqueurs dits d'*effet de l'alcool* [9, 28, 30]. **Cette nouvelle génération de biomarqueur ne cible plus l'alcoolisation maternelle mais l'atteinte neurodéveloppementale, facteur de risque majeur de troubles du comportement chez l'enfant.** Le PlGF placentaire se positionne comme un premier membre possible de cette nouvelle génération de biomarqueurs **même s'il reste encore à caractériser les conséquences à long terme des anomalies de l'angiogenèse cérébrale sur les troubles du comportement associés à l'alcoolisation *in utero*** (brevet Université-CHU-Inserm FR1555727/PCT2016 ; brevet Université-CHU-Inserm FR1661813/PCT2017).

Conclusion

Des avancées récentes ont été réalisées sur la caractérisation d'un axe fonctionnel « Placenta/Cerveau » impliqué dans le contrôle de l'angiogenèse cérébrale du fœtus. L'alcoolisation *in utero* induit un dysfonctionnement de cet axe et, en particulier, une diminution de l'expression de facteurs angiogéniques placentaires tels que le PlGF. Cet effet placentaire de l'alcool est impliqué dans le développement d'anomalies vasculaires cérébrales de l'enfant à naître. Une angiogenèse normale étant un pré-requis à l'établissement d'une neurogenèse correcte, ces avancées ouvrent la voie à l'identification d'une nouvelle génération de biomarqueurs placentaires d'atteinte cérébrale notamment pour le diagnostic précoce des troubles du neurodéveloppement/comportement causés par l'alcoolisation fœtale. **Il est important de souligner que des dysfonctions placentaires peuvent être observées dans d'autres contextes au cours de la grossesse et que les poly-intoxications sont plus souvent**

la règle que l'exception. Il apparait donc nécessaire de déterminer la spécificité de cette nouvelle génération de biomarqueurs d'alcoolisation afin d'évaluer si elle pourrait être transposable à d'autres facteurs de risque de troubles du neurodéveloppement tels que la pré-éclampsie ou encore la prématurité où *de facto* l'influence placentaire est perdue.

REMERCIEMENTS

Ce travail a reçu le soutien de l'ANR AlcoBrain, la Fondation pour la Recherche en Alcoologie, la Fondation de France, la Fondation Paralysie Cérébrale, Normandie Valorisation, le Conseil Régional de Normandie, le Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation, le programme européen FEDER. AlcoBrain est labélisé par le pôle de compétitivité Medicen-Paris Région.

LIENS D'INTERETS

Deux études aujourd'hui publiées [30 ; 40] ont donné lieu à des brevets dont plusieurs auteurs sont co-inventeurs (AL, BJG, ML, PM, SB, SJ, SM).

REFERENCES

1. Popova S, Lange S, Probst C, *et al.* Estimation of national, regional, and global prevalence of alcohol use during pregnancy and fetal alcohol syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health* 2017 ; 5 : e290-e299.
2. World Health Organization. Global status report on alcohol and health. https://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/gsr_2018/en 2018.
3. Toutain S, Germanaud D. Exposition prénatale à l'alcool et troubles causés par l'alcoolisation fœtale. *Expertise collective Inserm "Déficiences intellectuelles"*. <http://www.ipubli.inserm.fr> 2016.
4. Chasnoff IJ, Wells AM, King L. Misdiagnosis and missed diagnoses in foster and adopted children with prenatal alcohol exposure. *Pediatrics* 2015 ; 135 : 264-70.
5. Brownell M, Enns JE, Hanlon-Dearman A, *et al.* Health, social, education, and justice outcomes of manitoba first nations children diagnosed with fetal alcohol spectrum disorder: A population-based cohort study of linked administrative data. *Can J Psychiatry* 2018 ; 30 : 706743718816064.
6. Dawson G. Early behavioral intervention, brain plasticity, and the prevention of autism spectrum disorder. *Dev Psychopathol* 2008 ; 20 : 775–803.
7. Warren Z, McPheeters ML, Sathe N, *et al.* A systematic review of early intensive intervention for autism spectrum disorders. *Pediatrics* 2011 ; 127 : e1303–11.
8. Gutierrez HL, Hund L, Shrestha S, *et al.* Ethylglucuronide in maternal hair as a biomarker of prenatal alcohol exposure. *Alcohol* 2015 ; 49 : 617-23.
9. Bakhireva LN, Savage DD. Focus on: biomarkers of fetal alcohol exposure and fetal alcohol effects. *Alcohol Res Health* 2011 ; 34 : 56-63.
10. Karaçay B, Li S, Bonthius DJ. Maturation-dependent alcohol resistance in the developing mouse: cerebellar neuronal loss and gene expression during alcohol-vulnerable and -resistant periods. *Alcohol Clin Exp Res* 2008 ; 32 :1439-50.
11. Ramadoss J, Lunde ER, Chen WJ, *et al.* Temporal vulnerability of fetal cerebellar Purkinje cells to chronic binge alcohol exposure: ovine model. *Alcohol Clin Exp Res* 2007 ; 31 : 1738-45.
12. Naassila M, Pierrefiche O. GluN2B Subunit of the NMDA Receptor: The keystone of the effects of alcohol during neurodevelopment. *Neurochem Res* 2019 ; 44 : 78-88.
13. Ramoz N, Gorwood P. [Genetic factors in alcohol dependence]. *Presse Med* 2018 ; 47 : 547-553.
14. Gude NM1, Roberts CT, Kalionis B, *et al.* Growth and function of the normal human placenta. *Thromb Res* 2004 ; 114 : 397-407.
15. Alsat E, Guibourdenche J, Couturier A, *et al.* Physiological role of human placental growth hormone. *Mol Cell Endocrinol* 1998 ; 140 : 121-7.
16. Clark DE, Smith SK, Licence D, *et al.* Comparison of expression patterns for placenta growth factor, vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-B and VEGF-C in the human placenta throughout gestation. *J Endocrinol* 1998 ; 159 : 459-67.
17. Woods L, Perez-Garcia V, Hemberger M. Regulation of placental development and its impact on fetal growth-new insights from mouse models. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018 ; 9 : 570.
18. Belagodu AP, Fleming S, Galvez R. Neocortical developmental analysis of vasculature and their growth factors offer new insight into fragile X syndrome abnormalities. *Dev Neurobiol* 2017 ; 77 : 1321-1333.

19. Bergen NE, Bouwland-Both MI, Steegers-Theunissen RP, *et al.* Early pregnancy maternal and fetal angiogenic factors and fetal and childhood growth: the Generation R Study. *Hum Reprod* 2015 ; 30 : 1302-13.
20. Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res* 2010 ; 89 : 219-29.
21. Williams JK, Baptista PM, Daunais JB, *et al.* The effects of ethanol consumption on vasculogenesis potential in nonhuman primates. *Alcohol Clin Exp Res* 2008 ; 32 : 155-61.
22. Radek KA, Kovacs EJ, Gallo RL, *et al.* Acute ethanol exposure disrupts VEGF receptor cell signaling in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008 ; 295 : H174-84.
23. Radek KA, Matthies AM, Burns AL, *et al.* Acute ethanol exposure impairs angiogenesis and the proliferative phase of wound healing. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005 ; 289 : H1084-90.
24. Wang G, Zhong S, Zhang SY, *et al.* Angiogenesis is repressed by ethanol exposure during chick embryonic development. *J Appl Toxicol* 2016 ; 36 : 692-701.
25. Amankwah KS, Kaufmann RC. Ultrastructure of human placenta: effects of maternal drinking. *Gynecol Obstet Invest* 1984 ; 18 : 311-6.
26. Padmanabhan R. Histological and histochemical changes of the placenta in fetal alcohol syndrome due to maternal administration of acute doses of ethanol in the mouse. *Drug Alcohol Depend* 1985 ; 16 : 229-39.
27. Kaminski M, Rumeau C, Schwartz D. Alcohol consumption in pregnant women and the outcome of pregnancy. *Alcohol Clin Exp Res* 1978 ; 2 : 155-63.
28. Gabriel K, Hofmann C, Glavas M, *et al.* The hormonal effects of alcohol use on the mother and fetus. *Alcohol Health Res World* 1998 ; 22 : 170-7.
29. Burd LI, Roberts D, Olson M, *et al.* Ethanol and the placenta: A review. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2007 ; 20 : 361-75.
30. Lecuyer M, Laquerrière A, Bekri S, *et al.* PLGF, a placental marker of fetal brain defects after in utero alcohol exposure. *Acta Neuropathol Commun* 2017 ; 5 : 44.
31. Rosenberg MJ, Wolff CR, El-Emawy A, *et al.* Effects of moderate drinking during pregnancy on placental gene expression. *Alcohol* 2010 ; 44 : 673-90.
32. Davis-Anderson KL, Berger S, Lunde-Young ER, *et al.* Placental proteomics reveal insights into fetal alcohol spectrum disorders. *Alcohol Clin Exp Res* 2017 ; 41 : 1551-1558.
33. Haghighi Poodeh S, Salonurmi T, Nagy I, *et al.* Alcohol-induced premature permeability in mouse placenta-yolk sac barriers in vivo. *Placenta* 2012 ; 33 : 866-73.
34. Kalisch-Smith JI, Outhwaite JE, Simmons DG, *et al.* Alcohol exposure impairs trophoblast survival and alters subtype-specific gene expression in vitro. *Placenta* 2016 ; 46 : 87-91.
35. Carmeliet P, Tessier-Lavigne M. Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature* 2005 ; 436 : 193-200.
36. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011 ; 473 : 298-307.
37. Rempel RG, Hartz AMS, Bauer B. Matrix metalloproteinases in the brain and blood-brain barrier: Versatile breakers and makers. *J Cereb Blood Flow Metab* 2016 ; 36 : 1481-507.
38. Hodivala-Dilke K. α v β 3 integrin and angiogenesis: a moody integrin in a changing environment. *Curr Opin Cell Biol* 2008 ; 20 : 514-9.
39. Wilhelm CJ, Guizzetti M. Fetal alcohol spectrum disorders: an overview from the glia perspective. *Front Integr Neurosci* 2016 ; 9 : 65.
40. Jégou S, El Ghazi F, de Lendeu PK, *et al.* Prenatal alcohol exposure affects vasculature development in the neonatal brain. *Ann Neurol* 2012 ; 72 : 952-60.
41. Holbrook BD, Davies S, Cano S, *et al.* The association between prenatal alcohol exposure and protein expression in human placenta. *Birth Defects Res* 2019 ; Mar 19.

42. Loke YJ, Muggli E, Nguyen L, *et al.* Time- and sex-dependent associations between prenatal alcohol exposure and placental global DNA methylation. *Epigenomics* 2018 ; 10 : 981-991.
43. Carter RC, Chen J, Li Q, *et al.* Alcohol-related alterations in placental imprinted gene expression in humans mediate effects of prenatal alcohol exposure on postnatal growth. *Alcohol Clin Exp Res* 2018 ; doi: 10.1111/acer.13808.
44. Lan N, Chiu MP, Ellis L, *et al.* Prenatal alcohol exposure and prenatal stress differentially alter glucocorticoid signaling in the placenta and fetal brain. *Neuroscience* 2017 ; 342 : 167-179.
45. Broere-Brown ZA, Schalekamp-Timmermans S, Jaddoe VWV, *et al.* Fetal growth and placental growth factor umbilical cord blood levels. *Fetal Diagn Ther* 2018 ; 43 : 26-33.
46. Cao Y, Ji WR, Qi P, *et al.* Placenta growth factor: identification and characterization of a novel isoform generated by RNA alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun* 1997 ; 235 : 493-8.
47. Luna RL, Kay VR, Rätsep MT, *et al.* Placental growth factor deficiency is associated with impaired cerebral vascular development in mice. *Mol Hum Reprod* 2016 ; 22 : 130-42.
48. Van Bergen T, Etienne I, Cunningham F, *et al.* The role of placental growth factor (PlGF) and its receptor system in retinal vascular diseases. *Prog Retin Eye Res* 2019 ; 69 : 116-136.
49. Clarke DW, Steenaart NA, Slack CJ, *et al.* Pharmacokinetics of ethanol and its metabolite, acetaldehyde, and fetolethality in the third-trimester pregnant guinea pig for oral administration of acute, multiple-dose ethanol. *Can J Physiol Pharmacol* 1986 ; 64 : 1060-7.
50. Ren H, Salous AK, Paul JM, *et al.* Functional interactions of alcohol-sensitive sites in the N-methyl-D-aspartate receptor M3 and M4 domains. *J Biol Chem* 2008 ; 283 : 8250-7.
51. Valenzuela CF, Jotty K. Mini-Review: Effects of Ethanol on GABAA Receptor-mediated neurotransmission in the cerebellar cortex--recent advances. *Cerebellum* 2015 ; 14 : 438-46.
52. Tsai HH, Niu J, Munji R, *et al.* Oligodendrocyte precursors migrate along vasculature in the developing nervous system. *Science* 2016 ; 351 : 379-84.
53. Won C, Lin Z, Kumar T P, *et al.* Autonomous vascular networks synchronize GABA neuron migration in the embryonic forebrain. *Nat Commun* 2013 ; 4 : 2149.
54. Niemelä O. Biomarker-based approaches for assessing alcohol use disorders. *Int J Environ Res Public Health* 2016 ; 13 :166.
55. Kintz P, Villain M, Mandel A, *et al.* Les marqueurs de l'éthylisme chronique. Focus sur les approches immuno-chimiques. *Ann Toxicol Anal* 2009 ; 21 : 21-25.

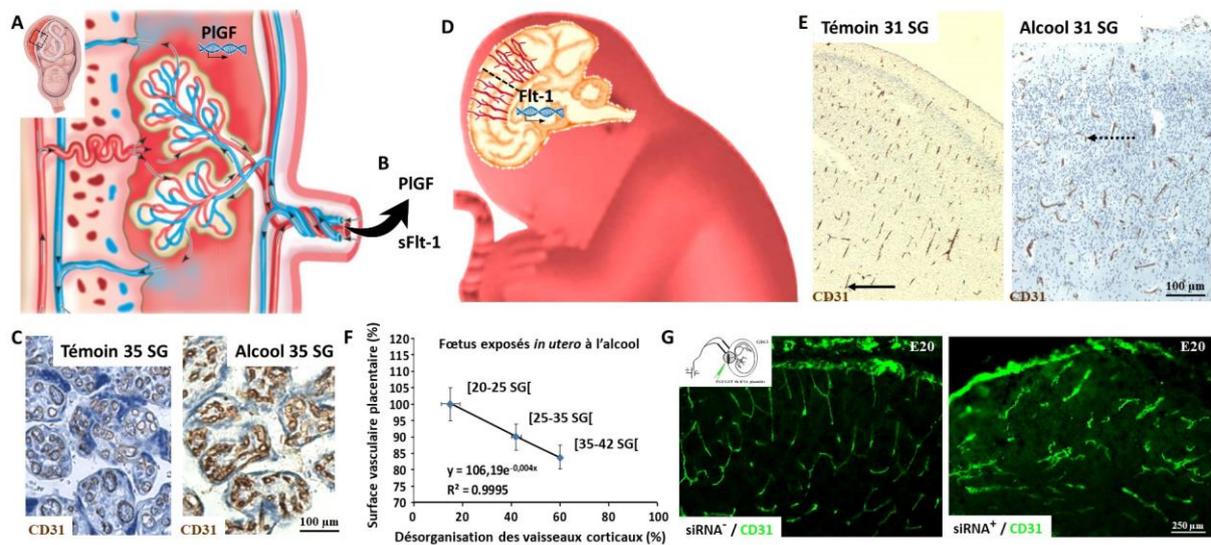


Figure 1. Synthèse graphique des effets de l'alcool sur les effets cortico-vasculaires liés à une dysfonction de l'axe Placenta/Cerveau. **A** : Chez l'Homme et le rongeur (Rat, Souris), le placenta est une source importante de PIGF et l'exposition *in utero* à l'alcool induit une réduction de l'expression du PIGF tant au niveau des transcrits [30] que de la protéine [29]. **B** : Le PIGF et son récepteur soluble sFlt-1 sont détectés au niveau du sang de cordon. Chez la Souris, du PIGF recombinant humain administré au niveau placentaire est rapidement véhiculé dans le cerveau fœtal [29] alors que chez l'Homme, de faibles taux circulants de PIGF au niveau du sang de cordon sont associés à un retard de croissance du fœtus [43]. **C** : L'effet de l'alcool sur l'expression du PIGF est associé à des anomalies de l'angiogenèse placentaire. Les photographies illustrent des villosités placentaires à 33 semaines gestationnelles chez un témoin et un cas alcool. On observe une réduction de la lumière des vaisseaux (couleur brune). **D**, **E** : Chez l'Homme, comme chez la Souris, une exposition *in utero* à l'alcool induit une désorganisation des microvaisseaux corticaux radiaux du fœtus et altère l'expression du récepteur au PIGF [38]. La flèche pleine ou discontinue indique des vaisseaux radiaux ou désorganisés, respectivement. **F** : Chez l'Homme, les anomalies de l'angiogenèse placentaire suite à une exposition *in utero* à l'alcool corrént avec les anomalies de l'angiogenèse cérébrale [38]. **G** : Chez la Souris, la répression de l'expression placentaire de PIGF par des ARN interférents mime les effets de l'alcool sur l'angiogenèse cérébrale alors que sa surexpression corrige les effets de l'alcool sur les anomalies de la vascularisation [38].

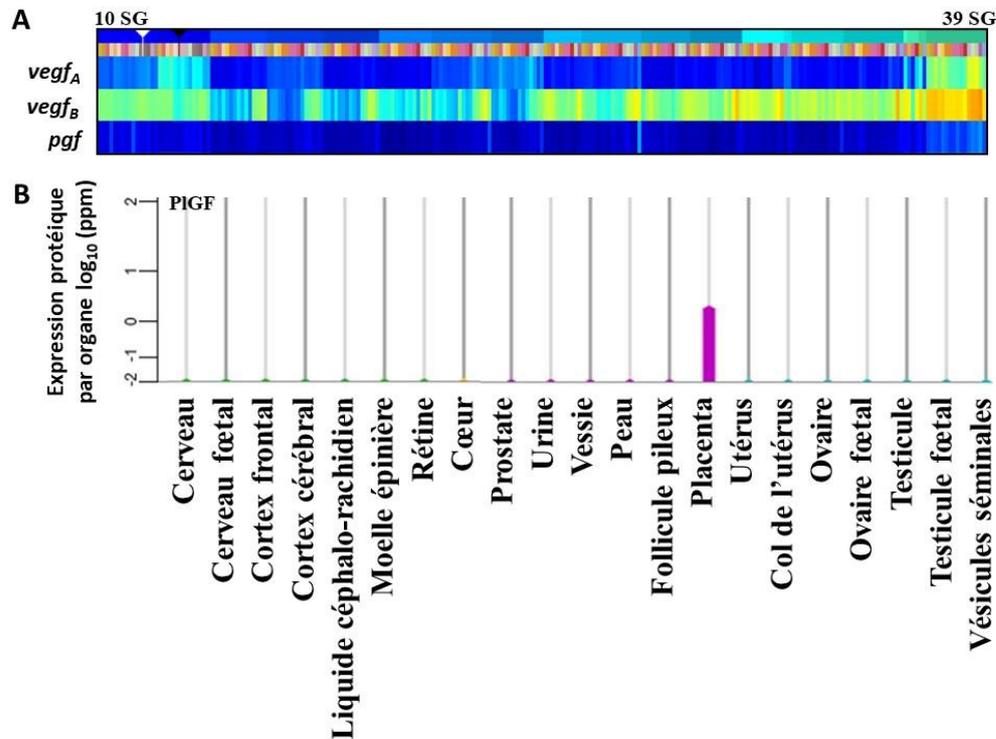


Figure 2. Profils d'expression transcriptomique et protéomique chez l'Homme du gène *pgf* et de la protéine PIGF. **A** : Illustration du profil d'expression transcriptomique du gène *pgf* après analyse de la base de données *BrainSpan, Atlas of the Developing Human Brain* dans le cerveau fœtal. Le profil visualisé s'étant de la 10^{ème} à la 39^{ème} semaine gestationnelle (SG) toutes structures cérébrales confondues. Les gènes codant le VEGF_A et le VEGF_B sont indiqués à titre de comparaison. <http://www.brainspan.org/> **B** : Expression comparée de la protéine PIGF dans différents organes après interrogation de la base de données *GeneCards, Human Gene Database*. La protéine PIGF est massivement exprimée par le placenta. <https://www.genecards.org/>

Marqueur	Tissu	Nature du marqueur	Références
Ethanol	Sang, urine, haleine	Direct	[9, 53, 54]
Esters éthyliques d'acides gras (FAEE)	Méconium, cheveux, placenta, plasma	Direct interaction de l'éthanol avec acides gras, triglycérides...	[9, 53, 54]
Ethylglucuronide (EtG)	Méconium, cheveux, urine, placenta, ongles	Direct interaction de l'éthanol avec l'acide glucuronique	[9, 53, 54]
Ethyl sulfate (EtS)	Méconium, urine, placenta	Direct métabolite de l'éthanol	[9, 53, 54]
Phosphatidylethanol (PEth)	Sang	Direct effet de la phospholipase D sur l'éthanol	[9, 53, 54]
Gamma glutamyl transférase (γ -GT)	Sérum, plasma	Indirect souffrance hépatique	[9, 53, 54]
Transaminases (ALAT, ASAT)	Sérum, plasma	Indirect souffrance hépatique	[53, 54]
Transferrine déficiente en carbohydrates (CDT)	Sang, sérum	Indirect atteinte d'une protéine hépatique	[9, 53, 54]
Volume globulaire moyen (VGM)	Sang	Indirect atteinte des érythrocytes	[9, 53, 54]

Table 1 : Liste de biomarqueurs indicateurs d'une exposition à l'alcool et relevant soit du métabolisme de l'alcool (marqueurs directs) soit des conséquences de la toxicité de l'alcool sur l'organisme (marqueurs indirects).

Etude 2

Impaired expression of the angiogenic placental factor CD146 by *in utero* alcohol exposure alters the fetal brain vasculature

Camille Sautreuil, Maryline Lecointre, Jessica Dalmasso, Marion Dumanoir, Matthieu Leuillier, Matthieu Lecuyer, Stéphane Marret, Carole Brasse-Lagnel, Sophie Gil, Bruno J. Gonzalez

En cours de soumission

La mise en œuvre du programme AlcoBrain au Laboratoire a permis d'identifier le PlGF d'origine placentaire comme premier candidat biomarqueur d'atteinte cérébrale. Ces travaux ont mené à plusieurs publications et une procédure de valorisation (3 brevets internationaux). Toutefois, hormis le PlGF, d'autres protéines associées au signalosome VEGF/PlGF sont fortement exprimées par le placenta et potentiellement sécrétées dans la circulation. C'est notamment le cas du CD146, qui, de ce fait, devient un possible second candidat des troubles de l'angiogenèse cérébrale associés à une exposition *in utero* à l'alcool et à une dysfonction de l'axe « placenta/cerveau ». Compte tenu de ces éléments, les objectifs de cette étude étaient de :

- caractériser le profil d'expression de CD146 dans le placenta humain et murin et dans le cerveau en développement chez la Souris
- déterminer si la forme soluble de CD146 est sécrétée dans la circulation
- étudier l'impact d'une alcoolisation *in utero* sur la forme membranaire et la forme soluble de CD146, ainsi que sur le signalosome chez la Souris
- rechercher si la répression de CD146 placentaire altère l'angiogenèse cérébrale

Abstract

Recent studies performed in both human and mouse showed that prenatal alcohol-exposure impairs the cortical angiogenesis of the fetus and that the repression of the placental angiogenic factor PlGF mimicked the deleterious effects of alcohol on the brain vasculature. These data support the existence of a functional placenta-brain axis involved in the control of the fetal brain angiogenesis and which could be impaired by *in utero* alcohol exposure. In addition to PlGF, CD146 is a pro-angiogenic factor involved in the placenta development and a co-receptor of VEGFR-2. Because, CD146 exists as a soluble form (sCD146), we hypothesized that it could contribute in the alcohol-induced vascular defects observed in the fetal brain. qRT-PCR experiments performed in the human placenta showed that CD146 and several members of its signalosome are expressed in developing villi. In addition, both membrane and soluble forms of CD146 proteins are detected from the first trimester to term. Moving to animal models, data showed that CD146 is expressed in mouse placenta from GD15 to GD20. CD146 immunoreactivity is visualized in the labyrinth zone and co-localizes with CD31-positive endothelial cells. Circulating sCD146 is also quantified by ELISA in the fetal blood. In the fetal brain, mCD146 is the major form detected by Western blot, while sCD146 expression strongly decreases in the brain at postnatal stages. Prenatal alcohol exposure induced a marked dysregulation of CD146 expression and of its signalosome in both placenta and fetal brain. In particular, *in utero* alcohol exposure induced a decrease of sCD146 levels in the placenta and in the fetal blood whereas sCD146 expression significantly increased in the fetal cortex. In addition, alcohol exposure resulted in a decrease of PSEN-1 expression in the placenta while it increased in the fetal brain. Finally, the targeted repression of CD146 expression in the placenta by *in utero* electroporation coupled to the CRISPR/Cas9 approach induced a marked disorganization of the cortical vasculature in the fetal brain. Altogether, these data support that the placental angiogenic factor CD146 contributes in the control of the fetal brain vasculature and that *in utero* alcohol exposure by altering the expression of its soluble form would impair a functional “Placenta/Brain” axis.

Keywords

Brain angiogenesis; Fetal Alcohol Spectrum Disorders; CD146; placenta; prenatal alcohol exposure

Introduction

Fetal alcohol syndrome (FAS) is the most severe expression of fetal alcohol spectrum disorders (FASD). It associates several clinical defects such as craniofacial dysmorphism, intrauterine growth retardation and neurodevelopmental defects leading to behavioral deficits (Riley *et al.*, 2011; Riley *et al.*, 2003). Based on these criteria, an early diagnosis of FAS is possible. Nevertheless, most children with FASD do not exhibit the characteristic physical features of FAS, but they are not devoid of neurobehavioral disabilities (attention deficits, hyperactivity), which remain undetected until they are school age (Chasnoff *et al.*, 2015). Consequently, numerous FASD infants are late or misdiagnosed and the challenge for clinicians consists in the early diagnosis of FASD, to intervene appropriately and save several years of care.

During pregnancy, the placenta is an ephemeral organ which provides oxygen, nutrients to the fetus and contributes to the clearance of catabolites released by the fetus. In addition to its key role in the control of the fetal metabolism, placenta also exerts important endocrine and immunomodulation functions which are vital for the establishment and the continuance of pregnancy. For example, secretions of placental growth hormone (PGH) or of human placental lactogen (hPL) are pivotal for the fetal growth (Alsat *et al.*, 1998). Moreover, the placenta is a major source of proangiogenic factors from the VEGF family such as the placental growth factor (PlGF; Cao *et al.*, 1997) and several reports described an impact of alcohol consumption during pregnancy on PlGF (Haghighi Poodeh *et al.*, 2012; Lui *et al.*, 2014). In particular, using a transcriptomic approach, Savage and co-workers showed that PlGF expression is reduced after moderate alcohol exposure (Rosenberg *et al.*, 2010) while a recent study reported that prenatal alcohol exposure during the last gestational week in mice resulted in a decrease of PlGF levels correlated with a marked disorganization of cortical vessels in the fetal brain (Lecuyer *et al.*, 2017). Altogether, these data raised the hypothesis of a functional “placenta/brain” axis, which could be involved in the control of the fetal brain angiogenesis. Consistent with this hypothesis, it has been recently shown that a targeted repression of PlGF expression in the placenta mimics the effects of prenatal alcohol exposure on the cortical vasculature whereas a placental overexpression of PlGF rescued the effects of alcohol on brain microvessels (Lecuyer *et al.*, 2017).

CD146 is a glycoprotein belonging to the immunoglobulin superfamily (Lehmann *et al.*, 1989). In endothelial cells, two isoforms of membrane CD146 (mCD146) generated by alternative splicing have been identified (Kebir *et al.*, 2010; Taira *et al.*, 1995). mCD146 isoforms displays angiogenic properties (Kebir *et al.*, 2010). In particular, they are involved in the stabilization of

neovessels junctions and in the regulation of the PlGF/VEGF signalosome (Jiang *et al.*, 2012; Stalin *et al.*, 2013). Indeed, mCD146 forms with angiomin, VEGF-R1, VEGF-R2 and presenilin-1 (PSEN-1) a complex molecular scaffold network in endothelial cells (Stalin *et al.*, 2016). In addition, it has been recently shown that mCD146 can be cleaved by an already undefined metalloproteinase, leading to a soluble and circulating form of CD146 (sCD146; Bardin *et al.*, 1998; Boneberg *et al.*, 2009). At a pathological level, sCD146 has been described as a marker of tumor growth and metastasis in human (Lehmann *et al.*, 1989; Sers *et al.*, 1994). Moreover, the involvement of membrane and soluble CD146 in physiological angiogenesis has been highlighted. For example, during pregnancy, a clinical study conducted in 50 pregnant women revealed that sCD146 is physiologically decreased in pregnant women. Furthermore, in a rat model, repeated systemic injection of sCD146 after mating cause a significant decrease in the pregnancy rate and the number of embryos (Kaspi *et al.*, 2013).

Besides PlGF, the placental endothelium expresses CD146 (Shih, 1999), and in light of the literature, we hypothesized that *i*) placental sCD146 would be released in the fetal blood and could reach the developing fetal brain, *ii*) the expression of mCD146 would be impaired by *in utero* alcohol exposure and *iii*) as a co-receptor of VEGFR-1/-2, CD146 may contribute in the control of the cortical organization of fetal microvessels. In order to test these hypothesis, we first intended to valid both membrane and soluble forms of CD146 expression in the human placenta before moving to the mouse in order to compare the CD146 expression profiles in the placenta, the fetal blood and the fetal brain. Then, we investigated the effects of prenatal alcohol exposure on CD146 expression and the PlGF/VEGF signalosome in both the placenta and the fetal brain. Finally, we characterized the effects of a placental CD146 repression in the development of the fetal brain vasculature.

Material and methods

Chemicals

Hœchst 33258, povidone iodine, bovine serum albumin (BSA) and protease inhibitor cocktail were obtained from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). The characteristics of the antibodies raised against angiotensin, CD31, CD146, GFP, presenilin-1, VEGF-R1, VEGF-R2 and β -actin are detailed in Table 1. The goat anti-rabbit IgG-HRP (sc-2030), the goat anti-mouse IgG-HRP (sc-2031), the donkey anti-goat IgG-HRP (sc-2033) and the CD146 CRISPR/Cas9 KO Plasmid (sc-429966) used for *in utero* electroporation were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Alexa Fluor® 594 donkey anti-rabbit IgG (A-21207), Alexa Fluor® 594 Donkey anti-rat IgG (A-21209), Alexa Fluor®488 Chicken anti-mouse IgG (A-21200), Alexa Fluor® 488 anti-rat IgG (A-21470) used for immunohistochemistry were from Invitrogen. The mouse sCD146 Elisa kit came from Elabscience® (Texas, USA). Isoflurane was from Baxter (Maurepas, France). The lysis buffer was from Cell signaling Technology (Danvers, MA).

In vivo treatment of pregnant mice

National Marine Research Institute (NMRI) mice from Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France) were used according to the recommendation of the French Ethical Committee and the European Directive (Council Directive 2010/63/EU, decree 2013-118, license no. 21CAE035), and experiments were performed under the supervision of authorized investigators (B.J.G., authorization n°7687 from the Ministère de l'Agriculture et de la Pêche). From gestational day (GD)15 to GD20, pregnant mice received a daily subcutaneous injection of sodium chloride (NaCl 9‰) or alcohol (3g/kg, Fisher Scientific) diluted in NaCl (50%, v/v). For prenatal stages (GD15, GD17, GD20), placentas and associated fetal brain were collected. For postnatal stages (P2, P5, P10, P15, P20), only brains were harvested. For quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) and Western blot studies, placentas and cortices were immediately frozen on dry ice and stored at -80°C. For histological studies, placentas and brains were immersed in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) containing 4% paraformaldehyde for 24 hours at 4°C. Then, they were incubated overnight in 30% sucrose and frozen in isopentane (-40°C). Frontal sections (25 μ m thick) were cut on a cryomicrotome (Leica Microsystems, Nanterre, France) and stored in a cryoprotective solution (20% glycerol, 30% ethylene glycol in 0.05 M PBS) at -80°C until use.

RNA extraction and qRT-PCR

Placentas from control and alcohol-exposed mice and the associated brain cortices from fetuses were harvested for total RNA extraction using the NucleoSpin® RNA plus (Macherey-Nagel, Hoerd, France), according to the manufacturer's recommendations. RNAs were retrotranscribed to cDNA using a Reverse Transcription System kit (Promega, Madison, WI) with reverse transcription buffer, MgCl₂, dNTP, and Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase (AMVRT) enzyme. The PCR reaction (40 cycles) was performed using a SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). The efficiency of PCR amplification was assessed for each primer set with the slope of a standard curve generated with serial dilution of placental and cortical brain cDNA which was close to 3.3. Quantitative RT-PCR was performed using gene-specific forward and reverse primers described in Table 2. For each sample, the purity of PCR product was controlled with the dissociation curves and cDNA amount was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as an internal control. The expression of GAPDH mRNA level was not affected by ethanol exposure.

Western blot analysis of mouse placenta and cortical extracts

Placentas and cortices from fetuses and neonates were homogenized in 250 μ L of lysis buffer (Cell Signaling Technology). The homogenates were centrifuged (18,213 g; 20 min) and then, the supernatants were used for Western blotting. Fifty micrograms of protein extracts from cortical and placental samples were suspended in Laemmli buffer (100 mM Hepes; pH 6.8; 10% β -mercaptoethanol; 20% SDS), boiled for 5 minutes. Then, they were loaded on 10% SDS-polyacrylamide gel. After electrophoresis, proteins were transferred on a nitrocellulose membrane. The membrane was incubated with different blocking solutions (1X TBS; 0.05% TWEEN 20; 5% nonfat milk or 1X TBS; 0.05% TWEEN 20; 5% BSA) at room temperature for 1 hours and a half, and incubated overnight with primary antibodies (Table 1). After incubation with the corresponding secondary antibodies coupled to peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), proteins were visualized using an enhanced chemiluminescence ECL Plus immunoblotting detection system (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Germany). The intensity of the immunoreactive bands was quantified using a blot analysis system (Bio-Rad Laboratories, Marne la coquette, France) and β -actin was used as a loading control. Commercial markers (Seebue prestained standard, Invitrogen) were used as molecular weight standards.

Immunohistochemistry

Placentas and brain slices previously fixed with 4% PFA in PBS were incubated overnight at 4°C with various primary antibodies (Table 1) diluted in incubation buffer (PBS containing 1% BSA and 3% Triton X-100). Next, the slices were rinsed twice with PBS for 20 min and incubated in the same buffer containing the appropriate secondary antibody. Cell nuclei were visualized by incubating the slices for 5 min with 1 g/L Hœchst 33258 in PBS. Fluorescent signals were observed with a Leica DMI 6000B microscope. The specificity of the immunoreactions was verified by omitting the primary antibodies.

***In utero* placental transfection of lentiviral vectors and repression of CD146 expression**

Pregnant mice at GD13 were anesthetized with isoflurane using an anesthetic vaporizer for a maximum of 40 min (Datex-Ohmeda, GE Healthcare, Aulnay sous bois, France). A laparotomy was performed to allow the access to uterine horns. The abdominal cavity, especially the exposed uterine horn, was kept moist with warmed physiological solution. During surgery, the body temperature of the mouse was controlled and maintained using a hotplate (Lab-Line, Instruments, Melrose Park, IL). Injections of CD146 CRISPR/Cas9 Knockout (KO) Plasmid (sc-429966) was done using micropipettes made of glass capillaries (0.58 mm inner diameter, 1.0 mm outer diameter, Harvard apparatus, UK) with a P-97 flaming/brown micropipette puller (Sutter Instrument Company; Novato, CA). CD146 CRISPR/Cas9 KO plasmids consisted in a pool of three target-specific lentiviral vectors each encoding the Cas9 nuclease and a guide RNA targeting 20 nucleotides designed to knock down gene expression. To define the exact injected volume, a millimeter scale was fixed on the capillary and calibrated with defined volumes. The injection depth within the placenta was 0.5 mm and 3 µL of the solution injected. For electroporation, the appropriate voltage was applied *via* specialized platinum electrodes Nepagene CUY 650P (Nepagene Co., Ichikawa, Japan) with the following parameters : interval cycle length 30 ms, interval pause 450 ms. The voltage conditions were controlled on the NEPA21 type II Electroporator (Nepagene Co., Ichikawa, Japan). After electroporation was done, the uterine horn was carefully replaced in the abdominal cavity and the abdominal walls was sutured with sterile Silk Suture Prolene 6-0, MPP2832 (ETHICON, Lindingö, Sweden). Mice were kept at a warm temperature on a hot plate until total recovery from anesthesia. Fetal brains corresponding to *in utero* transfected placentas were collected at E20 for CD146 Western blot experiments and vessel morphometric analysis.

Labeling and quantification of the cortical microvascular network in mice fetuses

To visualize the brain microvascular network on histological sections from control and alcohol-exposed animals, an immunohistochemistry targeting the endothelial cell marker CD31 was performed. Immunolabeling was analyzed under a DMI 6000 Fluorescence microscope (Leica) equipped with a CCD camera (Roper Scientific, Lisses, France). For vascular network measurements, a ratiometric approach was employed using the software Metamorph (Roper Scientific). Images of histological slices were acquired at standardized conditions (magnification, brightness) and saved in TIFF format using the computer assisted image analysis station from Roper Scientific. For each slice, the angular orientation of microvessels was quantified using the Metamorph Software. The quantification was performed in the fronto-parietal cortex and three fetuses from two different pregnant mice were analyzed per group. A frame of lines was defined perpendicular to the cortical border for each section. For microvessels parallel to these lines, the Metamorph Software arbitrary attributed the angular value 0°. The maximal angular value was 90°.

Quantification of mouse sCD146 levels by ELISA

Tissues (placenta and fetal cerebral cortex) from control and alcohol exposed mice were collected at GD20 and rinsed in ice-cold PBS to remove excess blood thoroughly. Tissue pieces were homogenized in PBS with a glass homogenizer on ice. The homogenates are then centrifuged for 20 minutes at 18,213 g to get the supernatant. At the same time, the plasma was collected using heparinized capillary tubes. After centrifugation (1546 g for 10 minutes), plasma was frozen until the assay. ELISA was then performed using the instructions provided in the commercial kit (Elabscience®, Texas, USA).

Statistical analyses

Statistical analyses were carried out using the biostatistics Prism software. Tests used for each experiment, the number of independent experiments and p values were summarized in Table 3.

Results

Expression pattern of CD146 and members of its signalosome in the human placenta

Because a previous study reported that CD146 contributes in the vascular development of the placenta (Kaspi *et al.*, 2013), we investigated its expression pattern in the human placenta as well as different members of its signalosome (PlGF, VEGF-R1, VEGF-R2 and PSEN-1; Fig. 1). qRT-PCR experiments showed no difference regarding the expression of CD146 mRNA in villous extracts obtained from placentas collected at three gestational stages (Fig. 1A). In contrast, the expression of PlGF ($p < 0.001$), VEGF-R1 ($p < 0.05$), VEGF-R2 and PSEN-1 ($p < 0.05$) progressively increased between the first trimester of pregnancy and term (Fig. 1B-E). In order to discriminate between the membrane and soluble forms of CD146, we performed Western blot experiments (Fig. 1F). The expression of mCD146 appeared significantly increased in villous extracts from the first trimester to term ($p < 0.05$) while sCD146 expression was unchanged (Fig. 1F).

Expression pattern of mCD146 and sCD146 in the mouse placenta

While a recent study showed that sCD146 contributes in the control of trophoblast migration and placental vascular development (Kaspi *et al.*, 2013), the expression pattern of this protein in the placenta remains poorly described. In order to characterize CD146 expression, we performed a time-course study in mouse using qRT-PCR and Western blot experiments (Fig. 2). At the mRNA level, CD146 expression was detected since GD15 and no significant modification of mRNA expression was found between the gestational stages even if an increase occurred at GD20 (Fig. 2A). At the protein level, Western blot experiments showed that the membrane form of CD146 progressively increased from GD15 to GD20 (Fig. 2B). This increase was significant at GD20 ($p < 0.05$; Fig. 2B). Regarding the soluble form of CD146, sCD146 was detected in the placenta at GD15. No significant expression level was measured between mCD146 and sCD146 at this stage (Fig. 2B). In contrast, at GD17 and GD20, the sCD146 protein expression was markedly lower than mCD146 ($p < 0.001$; Fig. 2B). Immunohistochemistry experiments showed a strong CD146 immunoreactivity in the labyrinth zone of the placenta at GD20 (Fig. 2C). The immunolabeling co-localized with CD31 immunoreactivity, a marker of endothelial cells (Fig. 2D-F).

Expression pattern of mCD146 and sCD146 in the fetal cortex in mouse

As performed for the placenta, the expression pattern of CD146 was investigated by qRT-PCR and Western blot in the developing cortex from embryonic day 15 (E15) to P20 (Fig. 3). mRNA expression of CD146 was detected for all stages and the one-way ANOVA analysis showed no age effect ($F=2.373$, $p=0.0661$; Table 3). In contrast, marked changes occurred regarding the protein expression (Fig. 3B). In particular, mCD146 expression was significantly affected by the development stage ($F=19.45$, $p<0.0001$; Table 3). In particular, a grouped analysis of fetal *versus* postnatal stages showed a marked decrease of mCD146 expression ($p<0.0001$; Fig. 3B, Table 3). Regarding the soluble form of CD146, sCD146 was detected at GD15 and poorly detected at all the other stages (Fig. 3B). Immunohistochemistry experiments performed at E20 showed that the CD146 immunostaining was radial and co-localized with the anti-CD31 labeling, indicating that CD146 immunoreactivity is preferentially associated to cortical microvessels (Fig. 3C-E). At P2, CD146 immunohistochemistry confirmed the Western blot data and showed a marked reduction of the CD146/CD31 ratio when compared to E20 (Fig. 3F). Interestingly, the CD146/CD31 ratio in the developing cortex at P2 was even more reduced when animals were previously perfused with phosphate buffer suggesting that a part of the CD146 staining would consist in the immunodetection of the circulating soluble form of CD146 (Fig. 3E-G). Consistent with these data, ELISA quantification revealed the presence of significant levels of sCD146 in the cephalic blood of P2 neonates (22.3 ng/ml \pm 2.4; Fig. 4).

***In utero* alcohol exposure impairs CD146 expression in the placenta and the fetal cortex.**

Several studies previously showed that alcohol impairs the expression of members from the VEGF/PlGF family in both placenta and brain (Jégou *et al.*, 2012; Rosenberg *et al.*, 2009). Because CD146 is a co-receptor of these pro-angiogenic factors, we investigated if alcohol would be able to alter CD146 expression (Fig. 4). qRT-PCR experiments revealed that a unique injection of alcohol (3 g/kg) per day to pregnant mice from GD15 to GD20 did not modify CD146 mRNA expression in the placenta at GD20 (Fig. 4A). In the same way, Western blot analysis showed that *in utero* alcohol exposure did not affect mCD146 expression (Fig. 4B, 4C). Conversely, alcohol treatment induced a strong decrease of sCD146 expression in the placenta ($p<0.001$; Fig. 4B, 4D). This effect of alcohol on sCD146 was associated to a reduction of the circulating sCD146 levels quantified by ELISA in the cephalic blood at two developmental stages, E20 and P2 ($p<0.05$; Fig. 4E). qRT-PCR and Western blot experiments were also conducted in the cortex of control and alcohol-exposed fetuses (Fig. 4F-I). As

observed for placenta, *in utero* alcohol exposure did not affect mRNA expression of CD146 in the cortex at E20 (Fig. 4F). Similarly, the cortical expression of mCD146 was not impaired by prenatal alcohol exposure (Fig. 4G, 4H). However, and contrasting to placenta, a significant increase of sCD146 protein expression was quantified in the cortex from E20 fetuses exposed to alcohol during pregnancy ($p < 0.05$; Fig. 4G, 4I). Altogether, these results indicate that *in utero* alcohol exposure impaired the expression of placental, circulating and cortical sCD146. In addition, they revealed opposite effects of alcohol between the placenta and the fetal cortex suggesting a possible compensatory process.

***In utero* alcohol exposure affects the CD146 signalosome in the placenta and the fetal cortex.**

At a mechanistic level, CD146 has been shown to interact with the VEGFR1/VEGF-R2 signalosome of endothelial cells in both *in vitro* and *in vivo* models (Stalin *et al.*, 2013; Stalin *et al.*, 2016; Jiang *et al.*, 2012). In particular, sCD146 plays a role of co-receptor and interacts with cell signaling proteins such as angiomin and presenilin-1 (PSEN-1; Stalin *et al.*, 2016). Based on these data, we, therefore, investigated the impact of *in utero* alcohol exposure on the VEGFR1/VEGF-R2 signalosome in both placenta and fetal cortex (Fig. 5). In the placenta, the quantification of VEGF-R1 expression by Western blot showed a decrease of VEGF-R1 expression in alcohol-treated mice at GD20 ($p < 0.05$; Fig. 5A). Similarly, a significant decrease of VEGF-R2 expression was quantified ($p < 0.01$; Fig. 5B). Regarding PSEN-1 expression, *in utero* alcohol exposure decreased the expression of the protease ($p < 0.05$; Fig. 5C) while no significant effect was found for angiomin even if its expression tends to increase after alcohol exposure (Fig. 5D). In the cortex of the matching fetuses, a strong reduction of VEGF-R1 expression was found in the alcohol-exposed group at E20 ($p < 0.05$; Fig. 5E) while the expression of VEGF-R2 was not modified (Fig. 5F). Unlike the placenta, PSEN-1 expression was strongly increased in the cerebral cortex of the fetus exposed to alcohol during pregnancy (Fig. 5C, 5G). Finally, as measured in the placenta, the cortical expression of angiomin was not significantly affected even if its expression tended to increase after exposure to alcohol (Fig. 5D, 5H). Altogether, these results indicate that *in utero* alcohol exposure impaired the CD146-associated VEGFR1/VEGFR2 signalosome with specific placenta/brain profiles.

Targeted repression of CD146 in the placenta impairs cortical angiogenesis in fetal brain.

Using pre-clinical and clinical approaches, recent studies showed that placental PlGF contributes in the control of the fetal brain angiogenesis (Lecuyer *et al.*, 2017). Because the present data revealed that *in utero* alcohol exposure alters the VEGFR1/R2 signalosome and, in particular, impairs sCD146 expression in the placenta and in the fetal blood, we investigated whether CD146 repression in the placenta would affect the fetal brain angiogenesis (Fig. 6). Invalidation of CD146 was performed using the CRISPR-Cas9 KO strategy. Visualization of eGFP fluorescence confirmed that electroporation occurred in the labyrinth zone of the placenta (Fig. 6A). Moreover, specificity of the transfection was controlled by Western blot experiments targeting both eGFP and mCD146 protein expression (Fig. 6B). When placentas were transfected by CRISPR-negative plasmids, mCD146 expression was not significantly reduced while eGFP was detected (Fig. 6B). In contrast, the transfection of the CRISPR-Cas9 KO lentiviral plasmids resulted in a marked reduction of mCD146 ($p < 0.05$; Fig. 6B). The visualization of the cortical vasculature from E20 fetuses matching with the transfected placentas was done by immunohistochemistry (Fig. 6C-E). In both untransfected and CRISPR-negative transfected placentas, CD31-positive microvessels had a preferential radial organization in the neocortex (Fig. 6C, 6D). In contrast, in animals from placentas previously transfected with the CRISPR-Cas9 KO plasmids, the positioning of microvessels in the developing cortex appeared disorganized (Fig. 6E). The quantification by morphometric analysis of the vessel orientation showed that in fetuses from CRISPR-Cas9 KO transfected placentas, the radial orientation of cortical microvessels was significantly impaired ($p = 0.0002$; Fig. 6F). Altogether, these data support that placental CD146 contributes in the control of the fetal brain angiogenesis.

Discussion

Despite an active primary prevention in several countries, the deleterious effects of alcohol on the fetal brain development remains a world health problem (Popova *et al.*, 2017). This is in part explained by the economic emergence of several countries associated to an increased spending power and an access to alcohol as recreational use and as a vector of social integration (WHO, 2018). For example, in Europe 1 in 4 women consume alcohol during pregnancy (WHO, 2018). Fetal alcohol syndrome (FAS) is the most severe expression of fetal alcohol spectrum disorder (FASD) and it associates several clinical signs such as craniofacial dimorphisms, growth retardation and neurodevelopmental deficits (Joya *et al.*, 2015). Based on these criteria, a perinatal diagnosis of FAS is possible. However, this is not the case of most FASD children who are frequently misdiagnosed until they are school age (Germanaud and Toutain, 2016; Chasnoff *et al.*, 2015). Indeed, although most of them do not exhibit the characteristic physical features of FAS, they will be not devoid of neurobehavioral disabilities. Thus, an early diagnosis of FASD infants who are estimated between 5 to 10 fold more numerous than FAS children (WHO, 2018) is a challenging objective for clinicians in order to avoid the loss of precious years of care (Chasnoff *et al.*, 2015).

CD146, a placental biomarker candidate of alcohol-induced brain disabilities?

It has been established that *in utero* alcohol exposure induced a marked disorganization of cortical microvessels in both mouse and human fetuses (Jégou *et al.*, 2012). The characterization of the mechanisms involved in this effect of alcohol revealed that placenta, by releasing pro-angiogenic factors such as PIGF, directly contributes in the control of the fetal brain angiogenesis (Lecuyer *et al.*, 2017). Consequently, placenta has been identified as a promising target organ for the early diagnosis of fetal brain disabilities, in general (O’Keeffe and Kenny, 2014), and of FASD, in particular (Lecuyer *et al.*, 2017). CD146 is a glycoprotein which has been validated as a prognostic biomarker in cancer (Luca *et al.*, 1993; Xie *et al.*, 1997; Lei *et al.*, 2015) based on its pro-angiogenic properties (Jiang *et al.*, 2012). At a mechanistic level, CD146 exists as membrane and soluble forms (Bardin *et al.*, 1998; Boneberg *et al.*, 2009) and it can interact with the VEGF/PIGF signalosome (Stalin *et al.*, 2016). In addition, at a physiological level, it has been shown to promote *in vitro* the migration of trophoblasts from the placenta. Altogether, these data supported that CD146 would represent a good biomarker candidate of placenta/brain dysfunction after *in utero* alcohol exposure. The

first step of the present study consisted in validating CD146 expression in the human and mouse placenta.

Expression patterns of CD146 in human and mouse placentas

Even if they are few, previous studies performed in mouse and human reported effects of CD146 on the placental physiology. In mouse, intrauterine injections of monoclonal CD146 antibodies cause pregnancy failure (Liu *et al.*, 2008) while in human, sCD146 inhibits the trophoblast migration (Kaspi *et al.*, 2013). Because CD146 is present as membrane or soluble forms, we first researched the expression of CD146 and members of the VEGF/PlGF family by qRT-PCR in human villous extracts from placentas collected at different gestational stages. While CD146 mRNAs were clearly detected in villous extracts, no significant evolution of CD146 mRNA expression was found between first trimester and term placentas. In contrast, PlGF mRNA expression, used as internal control, as well as two actors of the VEGF/PlGF receptor signalosome, VEGF-R1 and PSEN-1, significantly increased with the gestational age. Regarding protein expression, Western blot experiments showed that the membrane form of CD146 increased with the gestational age. In addition, the membrane *versus* soluble ratio of CD146 forms tends to increase with the gestational age. Same experiments were conducted in mouse placenta. In particular, CD146 mRNA expression did not significantly change between placentas collected at GD15, GD17 and GD20 (term) while both mCD146 protein expression and the mCD146/sCD146 ratio significantly increased with age. Taken together, these data indicate a very similar pattern of CD146 expression between human and mouse placentas and prompted us to move to this animal model in order to determine if CD146 would be involved in the alcohol-induced dysregulation of the angiogenic placenta-brain axis.

Expression patterns of CD146 in the fetal blood and mouse brain

Soluble CD146 results from the proteolytic cleavage of the membrane form of CD146 (Boneberg *et al.*, 2009). In order to reinforce the working hypothesis of a placenta/brain axis regarding the contribution of sCD146 in fetal brain angiogenesis, we first investigated whether sCD146 could be detected by ELISA in the fetal cephalic blood. Indeed, while the literature clearly evidenced sCD146 in the adult human blood in both physiological and pathological conditions (Kaspi *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2019), the presence of circulating sCD146 in mouse fetuses and neonates remained, to our knowledge, unknown. ELISA experiments performed at two developmental stages (E20 and P2) revealed sCD146 levels in the cephalic blood.

Interestingly, sCD146 levels were lower in neonates two days after delivery suggesting, almost in part, a possible placental origin of the circulating sCD146. To reinforce this hypothesis, it would be interesting to measure the capacity of placenta to release sCD146 and also to quantify sCD146 levels in the human fetal blood. Indeed, and consistent with these data, it has been recently shown that sCD146 would be a possible biomarker of human embryo selection for *in vitro* fertilization (Bouvier *et al.*, 2017).

As done for the placenta, the expression profile of CD146 was performed in the developing brain at different fetal and postnatal stages. As found for placenta, qRT-PCR experiments revealed no modifications of CD146 mRNA expression from E15 to P20. Western blot experiments showed marked differences regarding the expression of mCD146 in the brain which was markedly higher in fetal *versus* postnatal stages. Moreover, and contrasting to the placenta, sCD146 was poorly detected in the brain. Immunohistochemistry experiments showed a CD146 labeling that was restricted to microvessels and the immunoreactive signal was significantly reduced when animals were previously perfused with PBS, suggesting that a part of the CD146 immunoreactivity would correspond to circulating sCD146 as quantified by ELISA. Altogether these data indicate that in the developing brain CD146 expression is associated to microvessels and that sCD146 is poorly detected in the fetal brain when compared to the placenta. Such distribution pattern is very similar to this of PlGF which has been recently shown *i)* to be involved in the control of the fetal brain angiogenesis (Lecuyer *et al.*, 2017) and *ii)* to be dysregulated by prenatal alcohol exposure (Jégou *et al.*, 2012).

***In utero* alcohol exposure impairs the expression pattern of CD146 in both placenta, cephalic blood and developing brain.**

The similarities between the expression and functional patterns of PlGF and CD146 prompted us to research the effect of *in utero* alcohol exposure on CD146 expression. In the placenta, alcohol did not modify the expression of CD146 mRNA as well as its proteic membrane form. In contrast, soluble CD146 expression was markedly decreased. Because sCD146 results from the proteolytic cleavage of mCD146 (Boneberg *et al.*, 2009), these data suggest that alcohol would alter the processing of sCD146. Consistent with this hypothesis, it has been described in the literature that, during pregnancy, prenatal alcohol exposure impairs the expression of two metalloproteinases in the rat placenta (Rosenberg *et al.*, 2010). In the same way, ELISA experiments showed that sCD146 levels were reduced in the fetal blood from alcohol-exposed neonates, reinforcing a possible placental origin of the fetal circulating sCD146. In contrast, in

the fetal brain, while CD146 mRNA were not impacted, sCD146 expression was significantly increased. Altogether, these results indicate that alcohol inversely impact the expression of sCD146 between the placenta/blood, on one hand, and the fetal brain, on another hand. Such opposite effect of alcohol on the regulation of sCD146 expression would reinforce the hypothesis of a functional “placenta-brain” axis dysregulated by alcohol with the possibility of compensatory processes occurring in the brain. Consistent with this hypothesis, our data revealed different effects of prenatal alcohol exposure on different members of the VEGFR1/R2 signalosome. In particular, while PSEN-1 expression was decreased in the placenta, it was increased in the fetal cortex. All together, these data suggest that alcohol impaired the proteolytic activity of proteases involved in the processing of CD146. Among possible research avenues, it would be interesting to compare the activity of metalloproteinases in the placenta and fetal brain after *in utero* alcohol exposure.

CD146 repression in the placenta alters the cortical angiogenesis in the fetal brain.

The fact that alcohol differently impairs CD146 expression in the placenta and the fetal brain does not constitute the demonstration of a functional link between these two organs even if alcohol exposure has been shown to induce a strong deregulation of angiogenesis in both (Lecuyer *et al.*, 2017). The first functional interactions between the placenta and the fetal brain was shown for PlGF; a specific repression of PlGF expression in the placenta leads to a dysregulation of VEGF-R1 expression and a strong disorganization of cortical microvessels in the fetal brain (Lecuyer *et al.*, 2017). These results were comforted by the phenotype of *pgf* knockout mice which present disorganized cortical microvessels (Luna *et al.*, 2017). The fact that sCD146 is a circulating form strongly expressed by the placenta and retrieved in the fetal blood suggested a contribution of the placental sCD146 in the vascularization of the fetal brain. The present data showed that *in utero* electroporation of CD146 CRISPR/Cas9 plasmids strongly reduced, as expected, the placental expression of mCD146 (which is cleaved to generate sCD146). In addition, the placental gene repression of CD146 resulted in a marked alteration of the fetal brain angiogenesis. Taken together, these data strongly support that circulating placental members from the PlGF/VEGF family including sCD146 contribute in the control of the fetal brain angiogenesis. Consistent with these data, it has been recently shown that targeting soluble CD146 with a neutralizing antibody inhibits vascularization, growth and survival of CD146-positive tumors (Stalin *et al.*, 2016) while injection of CD146 morpholinos in zebrafish embryos impairs the development of the vasculature (Tu *et al.*, 2015).

In conclusion, the present data showed that during human gestation the placenta strongly express the membrane and soluble forms of the angiogenic factor CD146. In mouse, the expression pattern of CD146 in the placenta is very similar to the human's one and the soluble form is also detected in the fetal cephalic blood. *In utero* alcohol exposure oppositely impairs the expression of sCD146 in both placenta/fetal blood and fetal brain suggesting a compensatory process. Finally, the specific placental repression of CD146 results in a disorganization of the fetal brain vasculature and mimics clinical observations done in alcohol-exposed human fetuses. Altogether, these data reinforce the notion of a functional angiogenesis "Placenta-Brain" axis and support that the soluble form of CD146 would constitute with PIGF, a placental angiogenic factor with a biomarker value of alcohol-induced fetal brain disorder.

Acknowledgements

This work was supported by the Normandy University (UMR1245), the *Institut National de la Santé et Recherche Médicale* (INSERM; UMR1245), the Conseil Régional de Normandie, the LARC-Neuroscience network, and the Regional Platform for Cell Imaging (PRIMACEN), the Fondation Paralysie Cérébrale, the Fondation de France, the European funds FEDER, the ANR AlcoBrain. This study is labeled by the competitiveness cluster Medicen-Paris Region.

References

- Alsat E., Guibourdenche J., Couturier A., Evain-Brion D. (1998). Physiological role of human placental growth hormone. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 140:121-7. doi:10.1016/s0303-7207(98)00040-9
- Bardin N., Francès V., Combes V., Sampol J., Dignat-George F. (1998). CD146: biosynthesis and production of a soluble form in human cultured endothelial cells. *FEBS Letters*. 421:12-14. doi:10.1016/s0014-5793(97)01455-5
- Boneberg EM., Illges H., Legler DF., Fürstenberger G. (2009). Soluble CD146 is generated by ectodomain shedding of membrane CD146 in a calcium-induced, matrix metalloprotease-dependant process. *Microvascular Research*. 78:325-331. doi:10.1016/j.mvr.2009.06.012
- Bouvier S., Paulmyer-Lacroix O., Molinari N., Bertaud A., Paci M., Leroyer A., Robert S., Dignat George F., Blot-Chabaud M., Bardin N. (2017). Soluble CD146, an innovative and non-invasive biomarker of embryo selection for in vitro fertilization. *PLoS One*. 12:e0173724. doi:10.1371/journal.pone.0173724
- Cao Y., Ji WR., Qi P., Rosin A., Cao Y. (1997). Placenta growth factor: identification and characterization of a novel isoform generated by RNA alternative splicing. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 235:493-498. doi:10.1006/bbrc.1997.6813
- Chasnoff IJ., Wells AM., King L. (2015). Misdiagnosis and missed diagnoses in foster and adopted children with prenatal alcohol exposure. *Pediatrics*. 135:264-270. doi:10.1542/peds.2014-2171.
- Germanaud D., Toutain S. (2017). Exposition prénatale à l'alcool et troubles causés par l'alcoolisation fœtale. *Contraste*. 46:39-102. doi:10.3917/cont.046.0039
- Haghighi Poodeh S., Salonurmi T., Nagy I., Koivunen P., Vuoristo J., Räsänen J., Sormunen R., Vainio S., Savolainen MJ. (2012). Alcohol-induced premature permeability in mouse placenta-yolk sac barriers in vivo. *Placenta*. 33:866-873. doi:10.1016/j.placenta.2012.07.008
- Jiang T., Zhuang J., Duan H., Luo Y., Zeng Q., Fan K., Yan H., Lu D., Ye Z., Hao J., Feng J., Yang D., Yan X. (2012). CD146 is a coreceptor for VEGFR-2 in tumor angiogenesis. *Blood*. 120:2330-2339. doi:10.1182/blood-2010-01-406108
- Kaspi E., Guillet B., Percecchi-Marti MD., Alfaidy N., Bretelle F., Bertraud-Foucault A., Stalin J., Rambeloston L., Lacroix O., Blot-Chabaud M., Dignat-George F., Bardin N. (2013). Identification of soluble CD146 as a regulator of trophoblast migration: potential role in placental vascular development. *Angiogenesis*. 16:329-342. doi:10.1007/s10456-012-9317-6
- Kebir A., Harhoury K., Guillet B., Liu JW., Foucault-Bertraud A., Lamy E., Kaspi E., Elganfoud N., Vely F., Sabatier F., Sampol J., Pisano P., Kruithof EK., Bardin N., Dignat-George F., Blot-Chabaud M. (2010). CD146 short isoform increases the proangiogenic potential of endothelial progenitor cells in vitro and in vivo. *Circulation Research*. 107:66-75. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.213827
- Lecuyer M., Laquerrière A., Bekri S., Lesueur C., Ramdani Y., Jégou S., Uguen A., Marcorelles P., Marret S., Gonzalez BJ. (2017). PLGF, a placental marker of fetal brain defects after in utero

alcohol exposure. *Acta Neuropathologica Communications*. 5:44. doi:10.1186/s40478-017-0444-6

Lehmann JM., Riethmüller G., Johnson JP. (1989). MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 86: 9891–9895. doi:10.1073/pnas.86.24.9891

Lei X., Guan CW., Song Y., Wang H. (2015). The multifaceted role of CD146/MCAM in the promotion of melanoma progression. *Cancer Cell International*. 15:3. doi:10.1186/s12935-014-0147-z

Liu Q., Zhang B., Zhao X., Zhang Y., Liu Y., Yan X. (2008). Blockade of adhesion molecule CD146 causes pregnancy failure in mice. *Journal of Cellular Physiology*. 215:621-626. doi:10.1002/jcp.21341

Liu YY., Bin Y., Wang X., Peng H. (2019). Increased serum levels of soluble CD146 and vascular endothelial growth factor receptor 2 in patients with exudative age-related macular degeneration. *International Journal of Ophthalmology*. 12:457-463. doi:10.18240/ijo.2019.03.17

Luca M., Hunt B., Bucana CD., Johnson JP., Fidler IJ., Bar-Elia M. (1993). Direct correlation between MUC18 expression and metastatic potential of human melanoma cells. *Melanoma Research*. 3:35-41. PMID: 8471835

Lui S., Jones RL., Robinson NJ., Greenwood SL., Aplin JD., Tower CL. (2014). Detrimental effects of ethanol and its metabolite acetaldehyde, on first trimester human placental cell turnover and function. *PLoS One*. 9:e87328. doi:10.1371/journal.pone.0087328

O’Keeffe GW., Kenny LC. (2014). Predicting infant neurodevelopmental outcomes using the placenta? *Trends in Molecular Medicine*. 20:303-305. doi:10.1016/j.molmed.2014.04.005

Popova S., Lange S., Probst C., Gmel G., Rehm J. (2017). Estimation of national, regional, and global prevalence of alcohol use during pregnancy and fetal alcohol syndrome: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Global Health*. 5:e290-299. doi:10.1016/S2214-109X(17)30021-9

Riley EP., Infante MA., Warren KR. (2011). Fetal alcohol spectrum disorders: an overview. *Neuropsychology Review*. 21:73-80. doi:10.1007/s11065-011-9166-x

Riley EP., Mattson SN., Li TK., Jacobson SW., Coles CD., Kodituwakku PW., Adnams CM., Korkman MI. (2003). Neurobehavioral consequences of prenatal alcohol exposure: an international perspective. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 27:362–373. doi:10.1097/01.ALC.0000052703.38558.B2

Rosenberg MJ., Wolff CR., El-Emawy A., Staples MC., Perrone-Bizzozero NI., Savage DD. (2010). Effects of moderate drinking during pregnancy on placental gene expression. *Alcohol*. 44:673–690. doi: 10.1016/j.alcohol.2009.10.002

Sers C., Riethmüller G., Johnson JP. (1994). MUC18, a melanoma-progression associated molecule, and its potential role in tumor vascularization and hematogenous spread. *Cancer Research*. 54:5689-5694. PMID: 7923217

Shih IM. (1999). The role of CD146 (Mel-CAM) in biology and pathology. *The Journal of Pathology*. 189:4-11. PMID:10451481

Stalin J., Harhoury K., Hubert L., Garrigue P., Nollet M., Essaadi A., Muller A., Foucault-Bertaud A., Bachelier R., Sabatier F., Pisano P., Peiretti F., Leroyer AS., Guillet B., Bardin N., Dignat-George F., Blot-Chabaud M. (2016). Soluble CD146 boosts therapeutic effect of endothelial progenitors through proteolytic processing of short CD146 isoform. *Cardiovascular Research*. 111:240-251. doi:10.1093/cvr/cvw096

Stalin J., Harhoury K., Hubert L., Subrini C., Lafitte D., Lassitzky JC., Elganfoud N., Robert S., Foucault-Bertaud A., Kaspi E., Sabatier F., Aurrand-Lions M., Bardin N., Holmgren L., Dignat-George F., Blot-Chabaud M. (2013). Soluble melanoma cell adhesion molecule (sMCAM/sCD146) promotes angiogenic effects on endothelial progenitor cells through angiotonin. *The Journal of Biological Chemistry*. 288:8991-9000. doi:10.1074/jbcM112.446518

Taira E., Nagino T., Taniura H., Takaha N., Kim CH., Kuo CH., Li BS., Higuchi H., Miki N. (1995). Expression and functional analysis of a novel isoform of gicerin, an immunoglobulin superfamily cell adhesion molecule. *The Journal of Biological Chemistry*. 270:28681-28687. doi:10.1074/jbc.270.48.28681

World Health Organization. Global status report on alcohol and health. https://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/gsr_2018/en 2018.

Xie S., Luca M., Huang S., Gutman M., Reich R., Johnson JP., Bar-Eli M. (1997). Expression of MCAM/MUC18 by human melanoma cells leads to increased tumor growth and metastasis. *Cancer Research*. 57:2295-2303. PMID: 9187135

Figure legends

Figure 1: Expression of CD146, PlGF and members of the signalosome in the human placenta at three gestational stages. (A-E) Comparison of the relative expression of CD146 (A), PlGF (B), VEGF-R1 (C), VEGF-R2 (D) and PSEN-1 (E) by qRT-PCR from villous extracts at 8, 13 and 40 GW. (F) Quantification by Western blot of mCD146 and sCD146 protein levels in villous extracts from human placentas at 8, 13 and 40 GW. Each value is the mean (\pm sem) obtained from four different placentas. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ vs as indicated in the graphs.

Figure 2: Expression of CD146 in the mouse placenta at three gestational stages. (A) Comparison of the relative expression of CD146 by qRT-PCR in placenta extracts from mice at GD15, GD17 and GD20. Each value is the mean (\pm standard error of the mean) from three different placentae. (B) Quantification by Western blot of mCD146 and sCD146 protein levels at GD15, GD17 and GD20. A representative immunoblot is shown on the top of the graph. Two-way ANOVA showed significant gestational day (GD) and CD146 forms interactions (Table 3). # $p < 0.05$ vs GD15; **** $p < 0.0001$ vs mCD146 (C-F) Immunohistochemistry experiments showing the localization of CD146 expression in the placenta at GD20. CD146 immunoreactivity was detected in the labyrinth zone (A) and co-localized with the endothelial cell marker CD31 (arrows; D,F). Hœchst was used to label nuclei (E,F).

Figure 3: Expression of CD146 in the developing cortex. (A) Comparison of the relative expression of CD146 by qRT-PCR in the developing cortex at pre- and postnatal stages ranging from E15 to P20. Each value is the mean (\pm standard error of the mean) from three different cortices. (B) Quantification by Western blot of mCD146 and sCD146 protein levels at pre- and postnatal stages ranging from E15 to P20. A representative immunoblot is shown on the top of the graph. (C,D) Visualization by immunohistochemistry of CD146-positive labeling in the developing cortex at E20 (C). Note that CD146 immunoreactivity co-localizes with radial microvessels labelled with the endothelial cell marker CD31 (D; arrows). (E,F) Comparison of the CD146 immunolabeling in P2 cortices with no perfusion (npP2; E) or after intracardiac perfusion (pP2; F) with PBS. Note the presence of few CD31-positive vessels co-labelled with CD146 in perfused animals (F; arrow). (G) Quantification of the CD146/CD31 ratio in radial cortical microvessels from mouse fetuses (E20) and neonates (P2). Notes that in the brain of neonates previously perfused with PBS, the ratio is markedly decreased. **** $p < 0.0001$ vs fetal

group. ^{##}p<0.01, ^{####}p<0.0001 vs E20. ^{§§§§}p<0.0001 vs npP2. One-way ANOVA, two-way ANOVA, and post-test details are provided in Table 3.

Figure 4: Effect of *in utero* alcohol exposure on placental and cortical expression of CD146. (A) Effect of alcohol on CD146 mRNA expression in placental extracts from mice at GD20. (B-D) Visualization (B) and quantification by Western blot of the effects of fetal alcohol exposure on mCD146 (C) and sCD146 (D) proteins. (E) Effect of prenatal alcohol exposure on CD146 levels measured by ELISA in the cephalic brain from E20 fetuses and P2 neonates. (F) Effect of alcohol on CD146 mRNA expression in the cortex of E20 fetuses. (G-I) Visualization (G) and quantification by Western blot of the effects of fetal alcohol exposure on mCD146 (H) and sCD146 (I) proteins. *p<0.05, ***p<0.001 vs control group. Statistic details are provided in Table 3.

Figure 5: Effect of *in utero* alcohol exposure on placental and cortical expression of protein partners of the CD146 signalosome. (A-D) Quantification by Western blot in the placenta from GD20 pregnant mice of VEGF-R1 (A), VEGF-R2 (B), PSEN-1 (C) and angiomin (D). (E-H) Quantification by Western blot in the cortex from E20 fetuses of VEGF-R1 (E), VEGF-R2 (F), PSEN-1 (G) and angiomin (H). *p<0.05, **p<0.01 vs control group. Statistic details are provided in Table 3.

Figure 6: Impact of placental repression of CD146 on the cortical vasculature of E20 fetuses. (A) Visualization of eGFP expression by immunohistochemistry in the placenta at GD20. (B) Quantification by Western blot of mCD146, eGFP and actin proteins in placentae from non-electroporated placentas (Ctrl_{ne}), CRISPR-negative/GFP-positive transfected placentas (Ctrl CRISPR) and CD146 CRISPR-Cas9/GFP transfected placentas (CRISPR-Cas9) at GD20. Representative immunoblots are shown in the top panel of the graph. (C-E) Visualization of the vasculature in the cortex of fetuses from non-transfected (C), CRISPR-negative/GFP-positive (D) and CD146 CRISPR-Cas9/GFP-transfected (E) animals. (F) Distribution of the microvessel orientation in the developing cortex from non-transfected (Ctrl_{ne}), control plasmid-transfected (Ctrl_{cp}) and CD146 CRISPR-Cas9/GFP-transfected (CRISPR-Cas9) animals. Angle values are distributed in four classes. The class [0-25[corresponds to radial microvessels. Statistical analysis of vessel orientation was performed using χ^2 test. Statistic details are provided in Table 3.

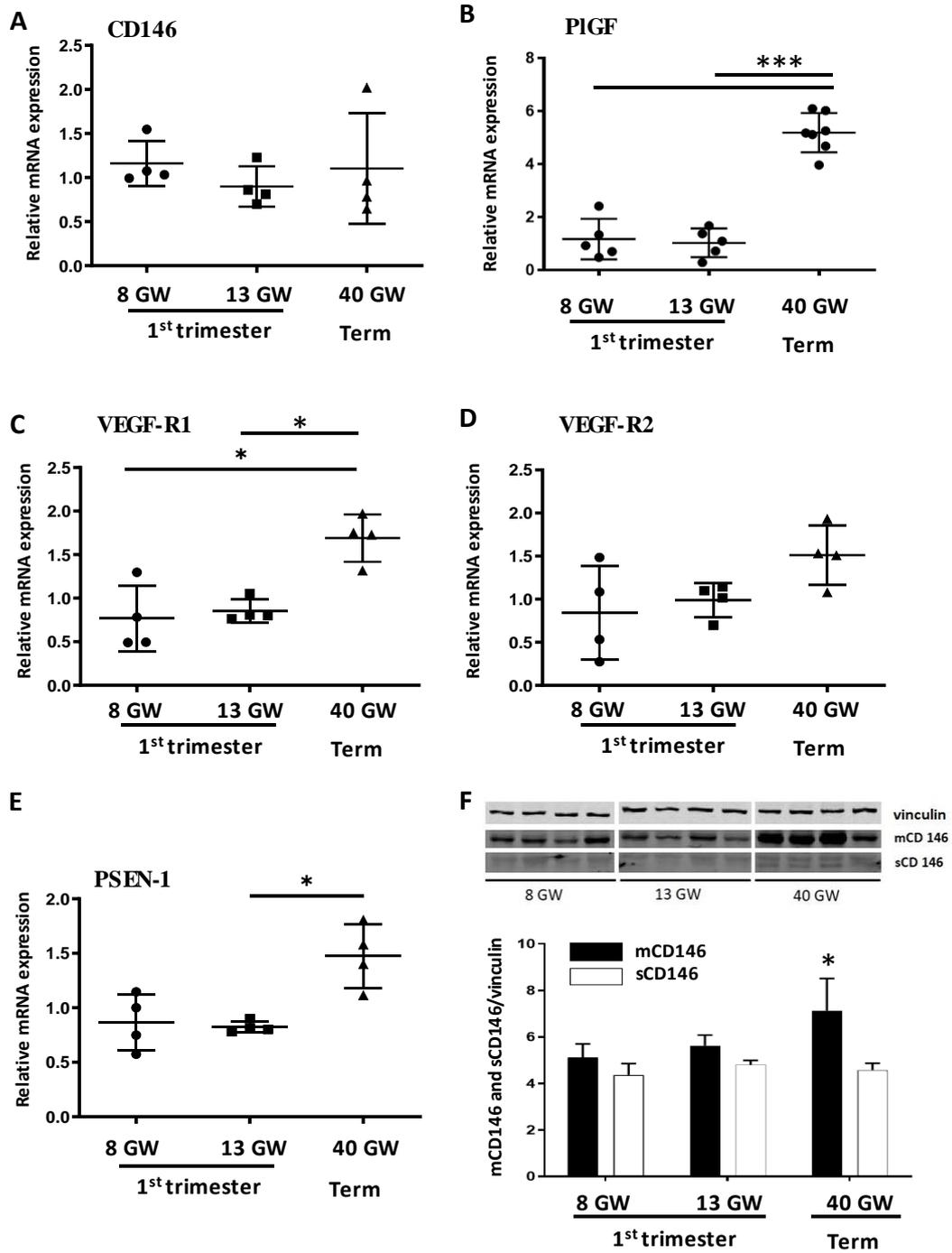


Figure 1

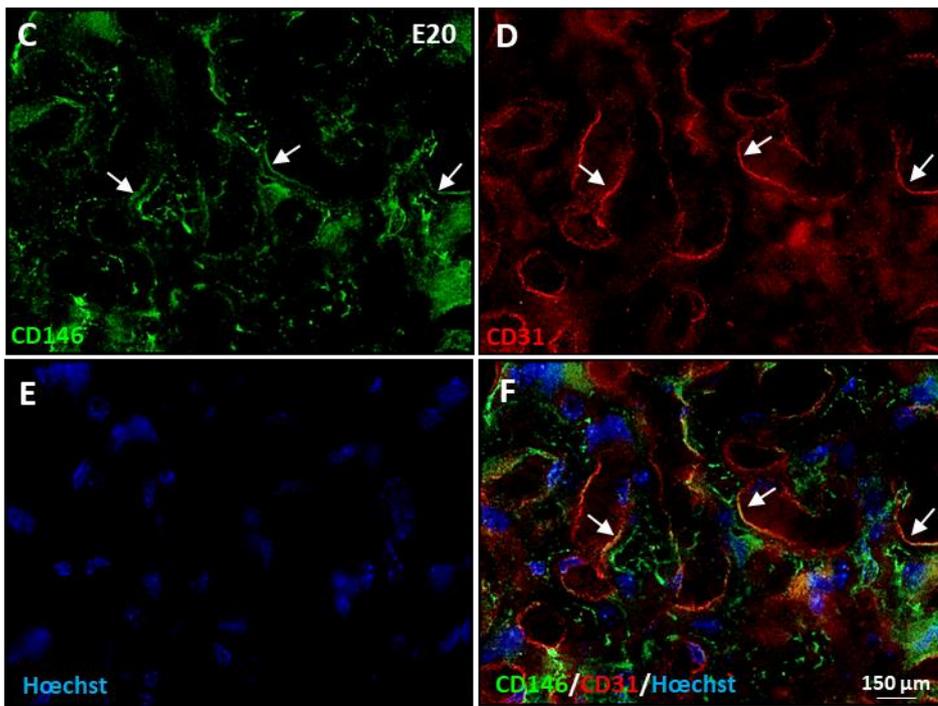
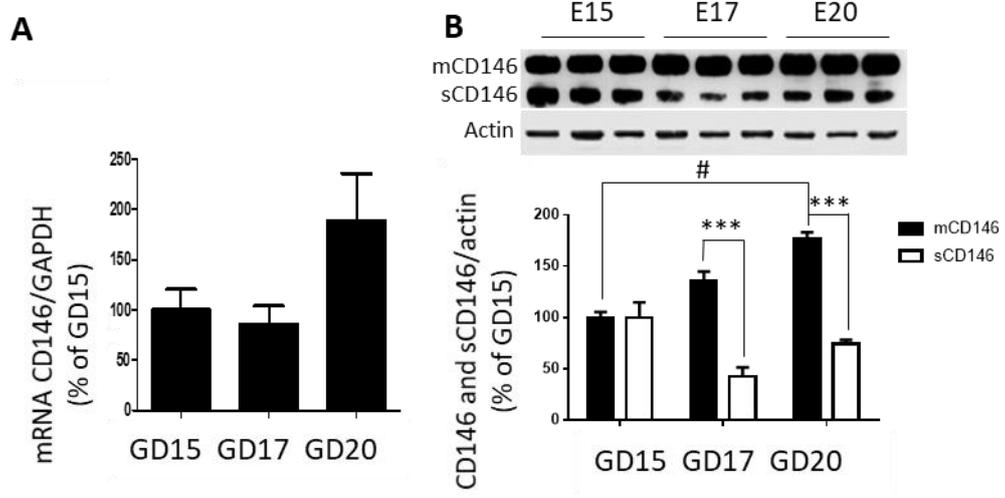


Figure 2

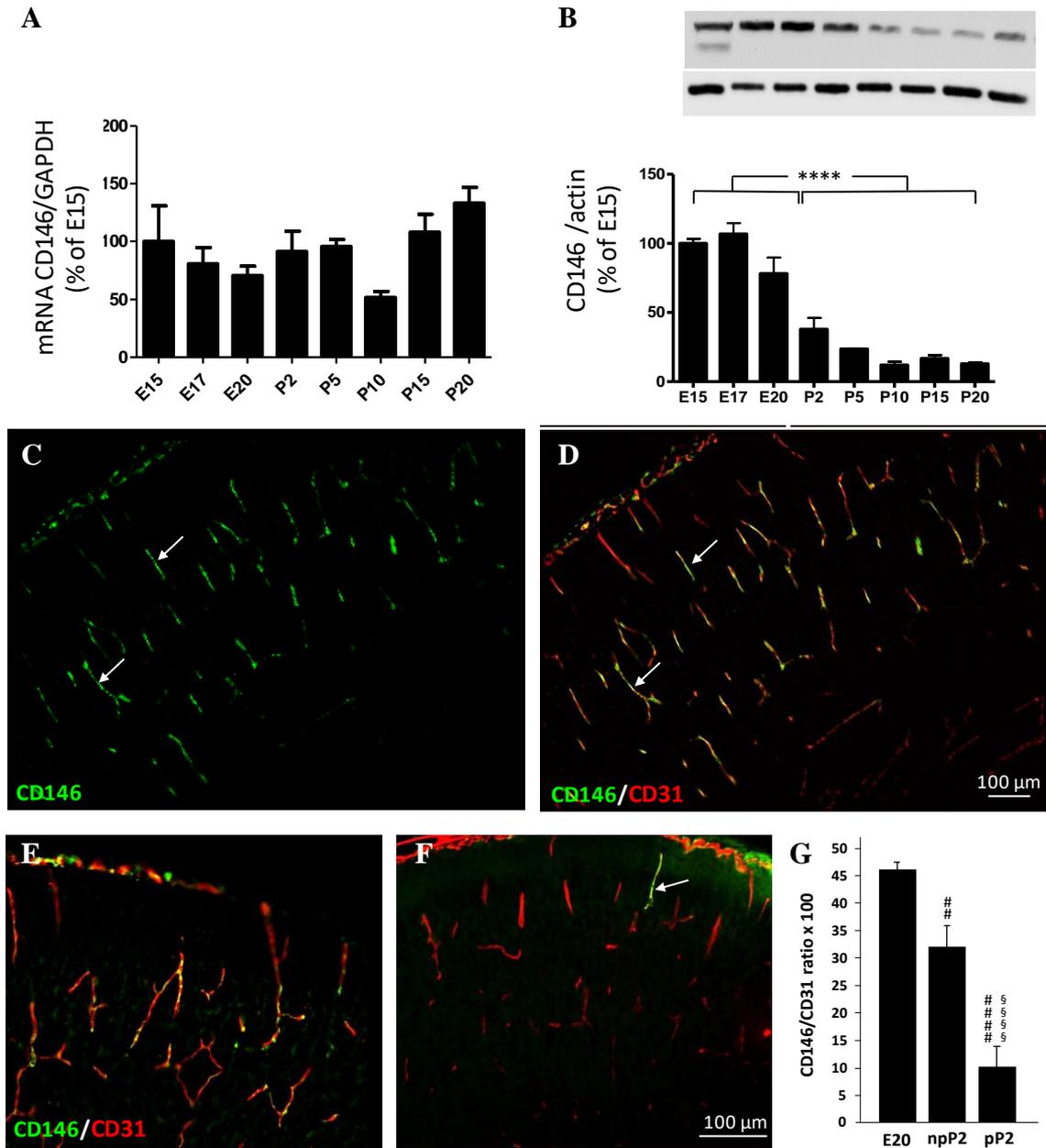


Figure 3

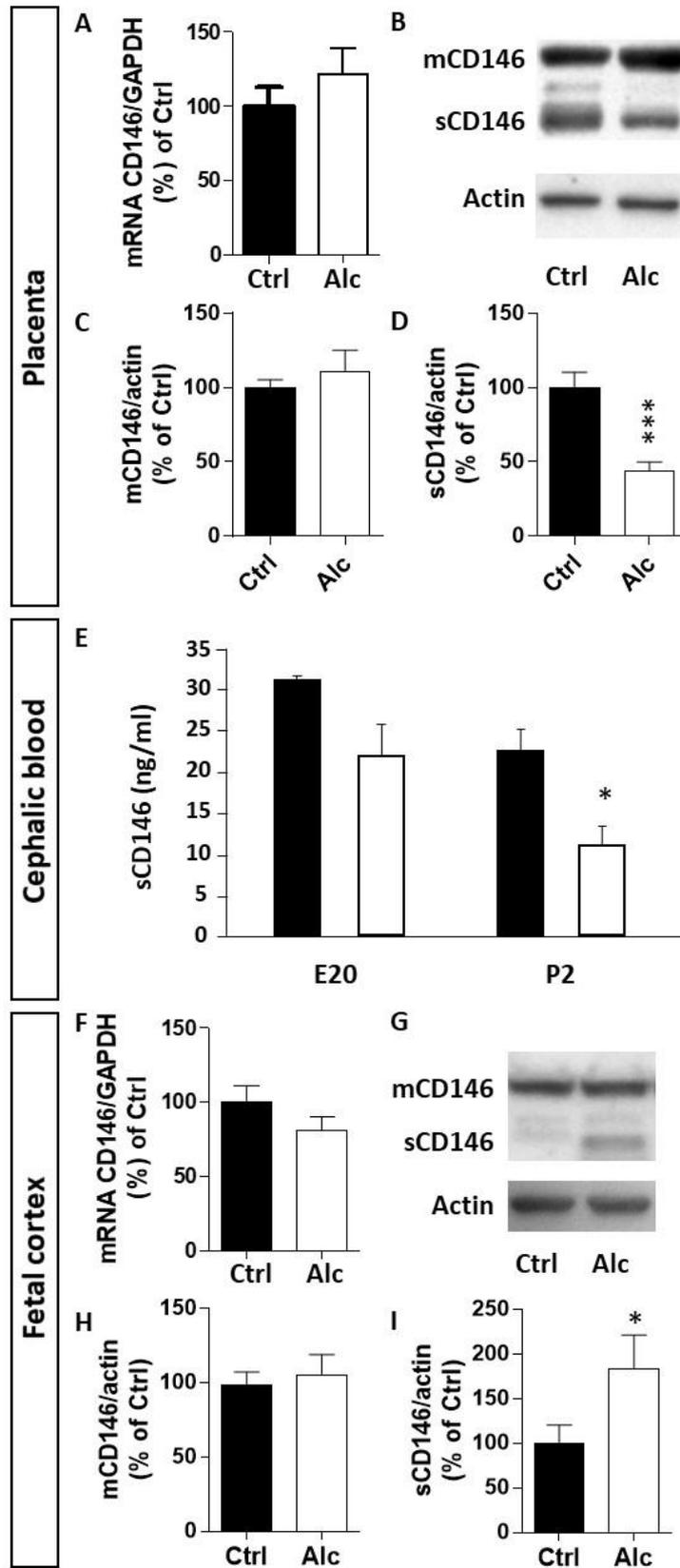


Figure 4

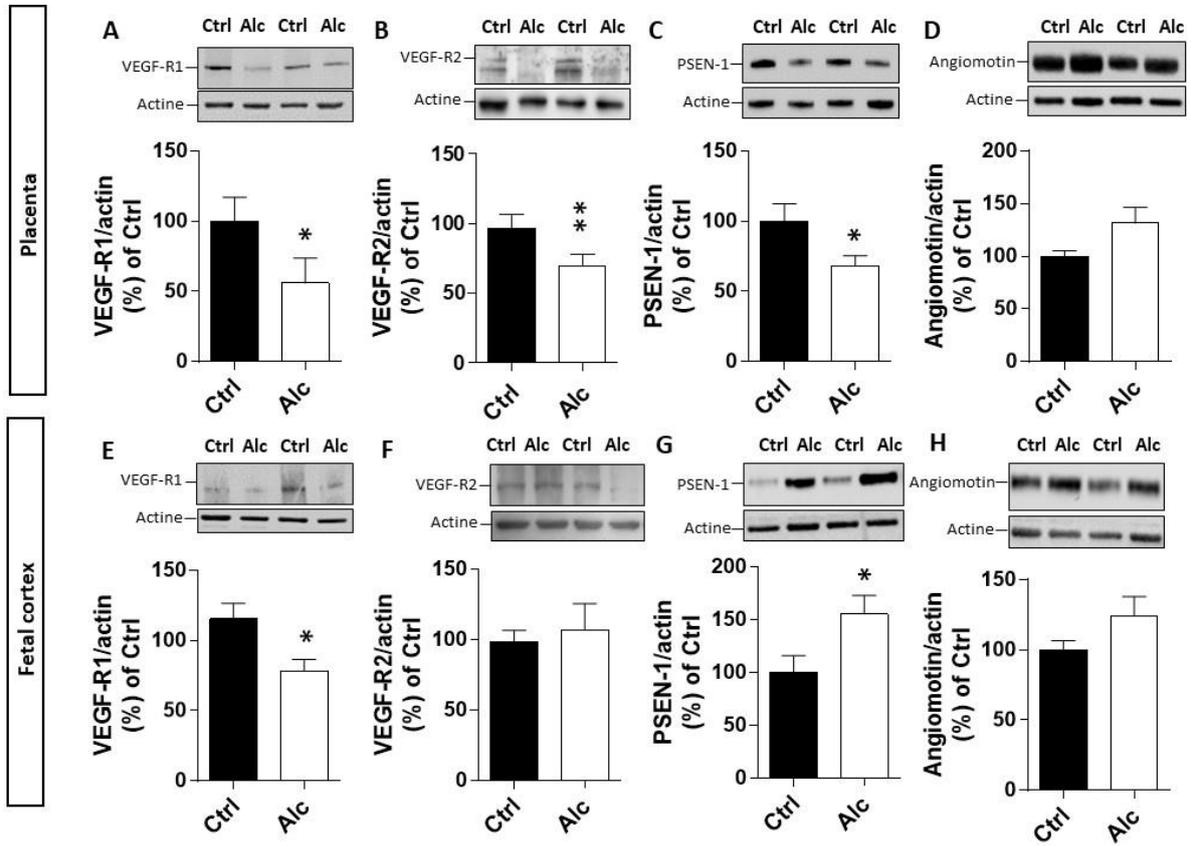


Figure 5

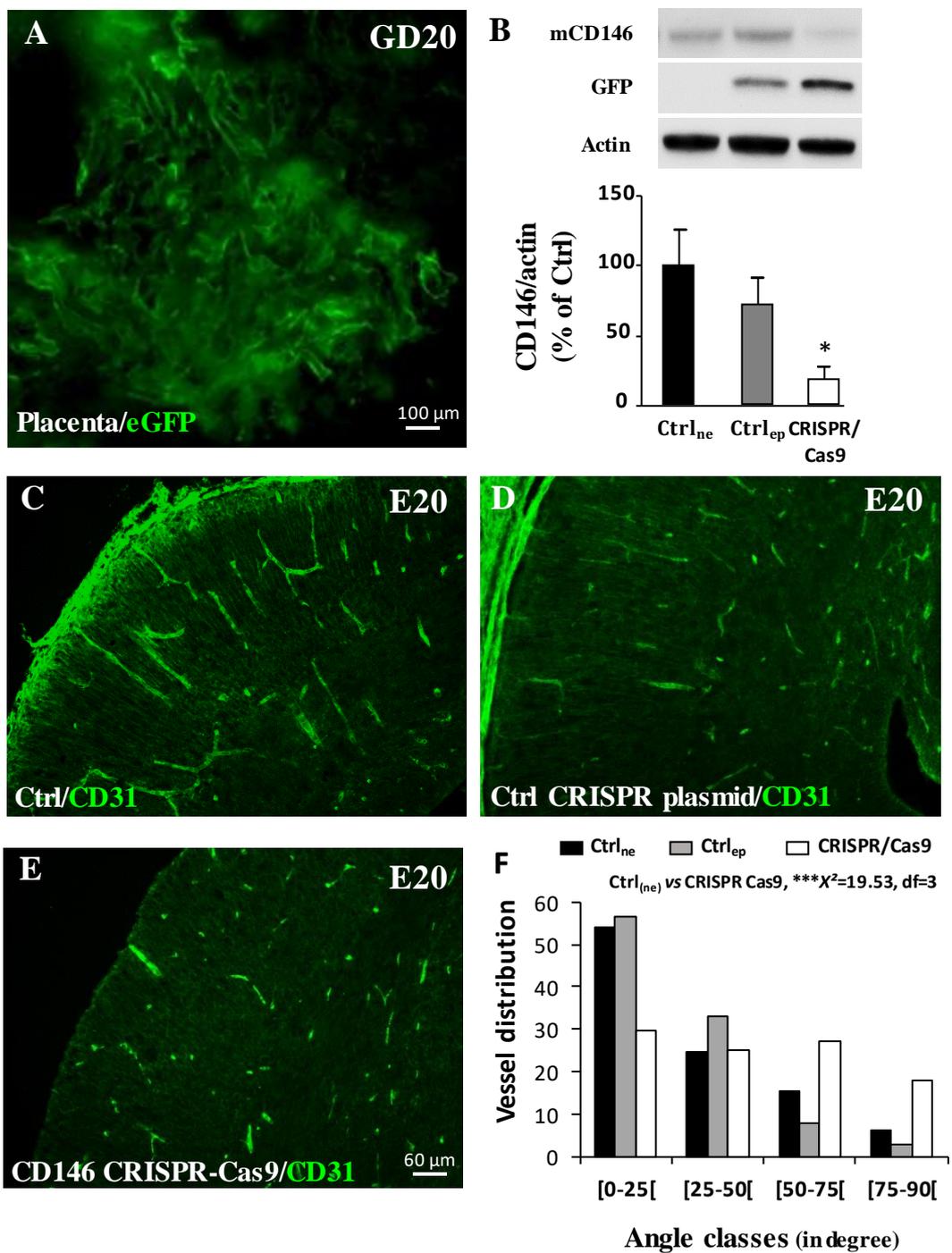


Figure 6

Table 1: Origin and characteristics of the primary antibodies used for the immunohistochemical and Western blot studies performed in mouse tissues.

Antibodies	Trade reference	Purified species	Species detection origin	Supplier	Dilution	Solution of incubation
PECAM/CD31	Mouse IHC : cat 550274	Rat	Mouse, Rat, Human	BD- Pharmigen	1/400	BSA (1% in PBS)
	WB : (M- 20) sc- 1506				1/1000	Milk (5% in TBST)
CD146	Mouse IHC : [P1H12] ab24577	Mouse	Mouse, Human, Dog	abcam	1/400	BSA (1% in PBS)
	WB : [P1H12] ab24577				1/1000	Milk (5% in TBST)
VEGF-R1/ Flt-1	Mouse IHC : (C-17) sc- 316	Rabbit	Mouse, Rat, Human	Santa Cruz	1/400	BSA (1% in PBS)
	WB : (C- 17) sc-316				1/1000	Milk (5% in TBST)
VEGF-R2/ Flk-1	Mouse IHC : (N-931) sc- 505	Rabbit	Mouse, rat, Human	Santa Cruz	1/400	BSA (1% in PBS)
	WB : (N- 931) sc- 505				1/1000	Milk (5% in TBST)
Angiomotin/ Amot	Mouse IHC : (G-12) sc- 515262	Mouse	Mouse, Human	Santa Cruz	1/400	BSA (1% in PBS)
	WB : (G- 12) sc- 515262				1/1000	Milk (5% in TBST)
Presenilin-1/ PSEN-1	Mouse IHC : ARP58941	Rabbit	Human, Mouse, Rat	Aviva systems biology	1/400	BSA (1% in PBS)
	WB : ARP58941				1/1000	Milk (5% in TBST)

β-actin	WB : A5441	Mouse	Mouse, Chicken, Rabbit, Rat, Human	Sigma- aldrich	1/5000	Milk (5% in TBST)
GFP	WB : ab6673	Goat	Mouse	abcam	1/1000	Milk (5% in TBST)

Table 2: Sequence of the primers used for qRT-PCR experiments.

Gene name	Gene-specific forward primer	Gene-specific reverse primer
GAPDH	5'-TCATGGCCTTCCGTGTTCTTA-3'	5'-CCTGCTTCACCACCTTCTTGA-3'
CD146/MCAM	5'-GGGCCTCAGGCAACTTCA-3'	5'-TTGGTGCACACGGAAAATCA-3'
VEGF-R1	5'-GGGTCCTCGTTCCAGTCTTTC-3'	5'-CGGCTGCTCCGATGTTT-3'
VEGF-R2	5'-GAGCCACATGGTCTCTCTGGTT-3'	5'-TGGTAGGAATCCATAGGCGAGAT-3'

Table 3: Statistical analyses

Experiments	Test	n independents experiments	p value *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001 ns, not significant
(Fig. 2A) mRNA CD146	One way ANOVA	n=3	ANOVA F 5.600 p=0.0608
(Fig. 2B) CD146	One way ANOVA Dunnett post-test	n=3	ANOVA F 7.200 p=0.0273* Dunnett's E15 vs E17 p=ns E15 vs E20 p=# E17 vs E20 p=ns
(Fig. 2B) sCD146	One way ANOVA	n=3	ANOVA F 5.956 p=0.0509
(Fig. 2B) CD146 vs sCD146	Two way ANOVA Bonferroni post-test	n=3	ANOVA Interaction F 26.90 p=0.0001*** Protein Levels F 53.43 p<0.0001*** Age F 11.85 p=0.0040*** Bonferroni's For E15 CD146 vs sCD146 p>0.05 For E17 CD146 vs sCD146 p<0.001*** For E20 CD146 vs sCD146 p<0.001***
(Fig. 3A) mRNA CD146	One way ANOVA	n=3	ANOVA F 2.373 p=0.0661 Tukey's P10 vs P20 p=0.0356*
(Fig. 3B) CD146	Unpaired t test	Fetal stages n=17 Postnatal stages n=14	Fetal vs postnatal stages p<0.0001****

(Fig. 3G) CD146/CD31	One way ANOVA Tukey's post hoc test	n=1	ANOVA F 29.12 P<0.0001**** Tukey's E20 vs npP2 p=0.0092** E20 vs pP2 p<0.0001**** npP2 vs pP2 p<0.0001****
(Fig. 4A) mRNA CD146	Shapiro-Wilk normality test Non- -parametric Mann Whitney test	Ctrl pregnant mice n=3 (21 embryos) Alc pregnant mice n=3 (21 embryos)	Ctrl p=0.0087 Alc p=0.0022 Ctrl vs Alc p=0.5956, ns
(Fig. 4C) mCD146	Shapiro-Wilk normality test Non- -parametric Mann Whitney test	Ctrl pregnant mice n=5 (32 embryos) Alc pregnant mice n=5 (27 embryos)	Ctrl p=0.8974 Alc p=0.0035 Ctrl vs Alc p<0.9310, ns
(Fig. 4D) sCD146	Shapiro-Wilk normality test Non- -parametric Mann Whitney test	Ctrl pregnant mice n=5 (32 embryos) Alc pregnant mice n=5 (27 embryos)	Ctrl p=0.0001 Alc p=0.0014 Ctrl vs Alc p<0.0001***
(Fig. 4E) sCD146 dosage	Two way ANOVA Bonferroni post test	Ctrl pregnant mice n= 3 (12 embryos) Alc pregnant mice n= 3 (12 embryos)	ANOVA Interaction ns (p=0.6411) [F(1, 7)=0.2373] Treatment effect p=0.0029, ** [F(1, 7)=20.06] Stages effect p=0.0045,** [F(1, 7)=16.88] Bonferroni's at P2 Ctrl vs Alc, p=0.0445, *
(Fig. 4F) mRNA CD146	Shapiro-Wilk normality test Non- -parametric Mann Whitney test	Ctrl pregnant mice n=3 (21 embryos) Alc pregnant mice n=3 (21 embryos)	Ctrl p=0.0248 Alc p=0.0257 Ctrl vs Alc p=0.2993, ns

(Fig. 4H) mCD146	Shapiro-Wilk normality test Unpaired t test	Ctrl n=16 (from 4 pregnant mice) Alc n=12 (from 3 pregnant mice)	Ctrl p=0.3298 Alc p=0.2118 Ctrl vs Alc p=0.6759, ns
(Fig. 4I) sCD146	Shapiro-Wilk normality test Unpaired t test	Ctrl n=16 (from 4 pregnant mice) Alc n=12 (from 3 pregnant mice)	Ctrl p=0.1251 Alc p=0.3660 Ctrl vs Alc p<0.05*
(Fig. 5A) VEGF-R1 placenta	Non-parametric Unpaired t test	Ctrl pregnant mice n=3 (10 embryos) Alc pregnant mice n=3 (10 embryos)	Ctrl p=0.3772 Alc p=0.0746 Ctrl vs Alc p=0.0122, *
(Fig. 5B) VEGF-R2 placenta	Shapiro-Wilk normality test Non- parametric Mann Whitney test	Ctrl pregnant mice n=5 (32 embryos) Alc pregnant mice n=5 (27 embryos)	Ctrl p<0.0001 Alc p<0.0001 Ctrl vs Alc p=0.0029, **
(Fig. 5C) PSEN-1	Shapiro-Wilk normality test Unpaired t test	Ctrl pregnant mice n=3 (11 embryos) Alc pregnant mice n=3 (10 embryos)	Ctrl p=0.2494 Alc p=0.6614 Ctrl vs Alc p=0.0448, *
(Fig. 5D) Angiomotin	Shapiro-Wilk normality test Unpaired t test	Ctrl pregnant mice n=3 (11 embryos) Alc pregnant mice n=3 (10 embryos)	Ctrl p=0.5375 Alc p=0.1481 Ctrl vs Alc p=0.0637, ns
(Fig. 5E) VEGF-R1	Shapiro-Wilk normality test Unpaired t test	Ctrl pregnant mice n=3 (10 embryos) Alc pregnant mice n=3 (10 embryos)	Ctrl p=0.8355 Alc p=1.700 Ctrl vs Alc p=0.0103, *

(Fig. 5F) VEGF-R2	Shapiro-Wilk normality test Unpaired t test	Ctrl pregnant mice n=3 (11 embryos) Alc pregnant mice n=3 (10 embryos)	Ctrl p=0.8008 Alc p=0.5955 Ctrl vs Alc p=0.6836, ns
(Fig. 5G) PSEN-1	Shapiro-Wilk normality test Non- -parametric Mann Whitney test	Ctrl pregnant mice n=4 (16 embryos) Alc pregnant mice n=4 (16 embryos)	Ctrl p=0.0036 Alc p=0.4710 Ctrl vs Alc p=0.0136, *
(Fig. 5H) Angiomotin	Shapiro-Wilk normality test Unpaired t test	Ctrl pregnant mice n=4 (18 embryos) Alc pregnant mice n=4 (17 embryos)	Ctrl p=0.6170 Alc p=0.1015 Ctrl vs Alc p=0.0914, ns
(Fig. 6B) mCD146	One way ANOVA Tukey's post hoc test	n=3 (3 CRISPR ⁻ /GFP ⁻ , 3 CRISPR ⁻ /GFP ⁺ , 3 CRISPR ⁺ /GFP ⁺)	ANOVA F 4.498 P=0.0404, * Tukey's p<0.05, * CRISPR ⁻ /GFP ⁻ vs CRISPR ⁺ /GFP ⁺
(Fig. 6F)	Chi-square test	n=3 (3 CRISPR ⁻ /GFP ⁻ , 3 CRISPR ⁻ /GFP ⁺ , 3 CRISPR ⁺ /GFP ⁺)	P<0.0001, ***

Chapitre 4

Discussion et perspectives

Malgré une prévention primaire active dans certains pays, les dernières données épidémiologiques mondiales indiquent que le nombre de femmes consommant de l'alcool au cours de la grossesse est en augmentation [131, 143]. Cette observation résulte de l'émergence du développement économique et de l'augmentation du niveau de vie par habitant de plusieurs pays tels que la Chine. L'exposition du fœtus à l'alcool constitue une cause majeure de handicap puisqu'elle peut donner lieu à un Syndrome d'Alcoolisation Fœtale (SAF), soit l'atteinte la plus sévère des Troubles Causés par l'Alcoolisation Fœtale (TCAF). Les anomalies développementales associées au SAF vont aider le clinicien à poser un diagnostic en période néonatale, notamment devant l'observation d'une dysmorphie craniofaciale caractéristique. Toutefois, une part non négligeable des enfants exposés *in utero* à l'alcool échappe à un diagnostic précoce en raison de l'absence d'atteintes anatomiques évidentes [138, 180]. Pourtant, ces enfants ne sont pas dépourvus de troubles neurologiques. En effet, les conséquences fonctionnelles neurodéveloppementales et comportementales se révéleront progressivement avec l'âge. Aussi, l'identification précoce des enfants TCAF permettrait d'envisager un accompagnement adapté dès le plus jeune âge, à une période de la vie où le potentiel de récupération est important. A l'heure actuelle, les biomarqueurs existants visent à rechercher une exposition à l'alcool et relèvent soit du métabolisme de l'alcool, soit des conséquences de la toxicité de l'alcool sur l'organisme. Cependant, les biomarqueurs d'exposition ne permettent pas d'établir un diagnostic précoce chez la plupart des enfants TCAF. Ainsi, l'objectif de ma thèse s'inscrivait dans le programme « AlcoBrain » du Laboratoire qui vise à rechercher des biomarqueurs dits *d'effet de l'alcool* ciblant l'atteinte neurodéveloppementale.

Alcoolisation fœtale et anomalies de l'angiogenèse cérébrale

Au cours du développement, le système nerveux central acquiert sa vascularisation par angiogenèse et de nombreux travaux démontrent qu'une angiogenèse cérébrale normale est un prérequis à l'établissement d'un neurodéveloppement correct [44, 48, 50]. En effet, l'angiogenèse cérébrale contribue à la mise en place de l'arborisation vasculaire qui assure aux

⁴⁴Carmeliet et Tessier-Lavigne, 2005, Nature

⁴⁸Won *et al.*, 2013, Nature Communication

⁵⁰Tsai *et al.*, 2016, Science

¹³¹Popova *et al.*, 2017, Lancet

¹³⁸Toutain et Germanaud, 2016, Contraste

¹⁴³WHO, 2018

¹⁸⁰Chasnoff *et al.*, 2015, Pediatrics

cellules nerveuses un apport en nutriments, en oxygène et en facteurs trophiques. Plusieurs groupes de recherche se sont intéressés à l'impact de l'alcoolisation *in utero* sur les processus de neurogenèse [154], de gliogenèse [158], de différenciation ou encore de survie cellulaire (Table 3).

Impact de l'alcoolisation <i>in utero</i> sur le système nerveux central	Références
Perturbation de la prolifération et de la migration des cellules neuronales	[154 ; 155 ; 161]
Augmentation de la mort par apoptose des cellules neuronales	[156, 198]
Troubles de la gliogenèse	[179, 197]
Retard dans la production des astrocytes	[158, 195]
Retard de la maturation des cellules de Purkinje	[178, 196]
Trouble de la maturation des oligodendrocytes	[159]

Table 3 : Exemple de travaux de la littérature illustrant les atteintes du développement cérébral associées à une alcoolisation *in utero* dans des modèles animaux.

En revanche, très peu d'études ont exploré l'éventuelle contribution d'une composante endothéliale dans les atteintes cérébrales décrites chez les enfants exposés *in utero* à l'alcool. A titre d'exemple, une analyse de la base de données *Pubmed* à l'aide des mots clés *alcohol, brain, development*, incrémentés des termes *migration, neurogenesis, survival* ou *differentiation* indique respectivement 133, 165, 460, et 436 publications alors que pour le terme *angiogenesis*, seulement 25 études sont identifiées. Ainsi, des données obtenues chez le primate non humain adulte indiquent que la consommation d'alcool réduit la formation des capillaires vasculaires [164]. De plus, il a été montré que l'alcool altère *in vitro* la signalisation du VEGF-

¹⁵⁴El Fatimy *et al.*, 2014, EMBO Molecular Medicine

¹⁵⁵Luo et Miller, 1998, Brain Research Reviews

¹⁵⁶Ikonomidou *et al.*, 2000, Science

¹⁵⁸Manzo-Avalos et Saavedra-Molina, 2010, International Journal of Environmental Research and Public Health

¹⁵⁹Coutts et Harrison, 2015, Alcoholism, Clinical and Experimental Research

¹⁶¹Miller, 1993, Alcoholism, Clinical and Experimental Research

¹⁶⁴Williams *et al.*, 2008, Alcoholism, Clinical and Experimental Research

¹⁷⁸Lewandowska *et al.*, 2012, Folia Neuropathologica

¹⁷⁹Guerra *et al.*, 2011, Neurotoxicology

¹⁹⁵Rubert *et al.*, 2006, Journal of Neuroscience Research

¹⁹⁶Volk *et al.*, 1981, Acta Neuropathologica

¹⁹⁸Farber *et al.*, 2010, Neurobiology of Disease

A dans une lignée de cellules endothéliales [165]. Au cours du neurodéveloppement, une étude du Laboratoire réalisée chez la Souris a montré qu'une exposition quotidienne à l'alcool au cours de la dernière semaine de gestation se traduit par une diminution de l'expression corticale de VEGF-R2 chez les souriceaux âgés de deux jours [160]. Ces travaux ont également démontré une réduction de la densité vasculaire corticale et une perte de l'orientation radiale des microvaisseaux dans le cerveau des souriceaux [160].

Le placenta, une source de facteurs pro-angiogéniques

Le placenta est un organe transitoire indispensable au maintien de la grossesse et à la croissance du fœtus, et une source majeure de facteurs angiogéniques. D'un point de vue cellulaire et moléculaire, l'impact de l'alcool sur l'angiogenèse du placenta humain a récemment été précisé [67]. L'étude comparée de 42 placentas exposés à l'alcool *versus* 41 placentas témoins sur une période allant de 21 à 42 semaines gestationnelles indique que la 30^{ème} semaine gestationnelle constitue une période charnière. En effet, alors qu'avant cet âge gestationnel, l'alcool ne modifie ni la densité des villosités ni la morphologie vasculaire, à partir de la 30^{ème} semaine jusqu'au terme, les placentas exposés à l'alcool présentent une réduction importante de la surface luminale vasculaire qui s'amplifie avec l'âge gestationnel [67]. Cette anomalie développementale est associée à une diminution de l'expression de protéines impliquées dans les jonctions serrées telles que *Zonula Occludens 1* (ZO-1), et de membres de la famille du VEGF tels que le VEGF-A et le PlGF. Concernant le PlGF, une analyse transcriptomique chez le Rat a fait ressortir, dans les placentas exposés à l'alcool, une diminution significative des taux d'ARNm codant le PlGF [133]. De plus, une étude récente a mis en évidence qu'une répression placentaire du PlGF chez la Souris entraînait des anomalies de l'angiogenèse cérébrale chez le fœtus, comparables à celles observées chez l'Homme suite à une alcoolisation *in utero*. Ces études ont permis d'établir l'existence d'un axe fonctionnel Placenta-Cerveau et son implication dans le contrôle de l'angiogenèse cérébrale [67, 160]. Ces dernières années, le placenta est donc devenu une source potentielle de biomarqueurs de troubles du développement fœtal [134]. Ainsi, en plus du PlGF, un autre facteur angiogénique placentaire pourrait venir compléter l'identification de biomarqueurs placentaires d'atteintes cérébrales chez l'enfant

⁶⁷Lecuyer *et al.*, 2017, Acta Neuropathological Communications

¹³³Rosenberg *et al.*, 2010, Alcohol

¹³⁴O'Keeffe et Kenny, 2014, Trends in Molecular Medicine ¹⁶⁰Jégou *et al.*, 2012, Annals of Neurology

¹⁶⁰Jégou *et al.*, 2012, Annals of Neurology

¹⁶⁵Radek *et al.*, 2008, American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology

TCAF. Il s'agit du CD146. Initialement, le CD146 a été identifié comme étant un marqueur de cellules malignes chez l'Homme [87]. En effet, dans les cellules de mélanomes humaines, l'expression du CD146 sous sa forme soluble est un marqueur de mauvais pronostic [181, 182, 183]. Si on s'éloigne du contexte tumoral, on s'aperçoit que l'expression du CD146 est perturbée dans des pathologies responsables de réactions inflammatoires cutanées. A titre d'exemple, le CD146 membranaire est surexprimé dans les kératinocytes de l'épiderme de personnes atteintes de psoriasis [184]. Quant à la forme soluble, des variations dans ses taux ont été décrites dans un certain nombre de maladies inflammatoires [185]. Dans le cas de la maladie de Crohn et de la colite ulcéreuse, les taux de sCD146 sont diminués [186]. Des taux plus élevés de sCD146 ont été observés dans le liquide synovial de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde [187]. Dans le cas d'une dysfonction de l'axe « Placenta-Cerveau », le profil d'expression de la forme membranaire et de la forme soluble du CD146 restait mal connu. Des études immunohistochimiques menées chez l'Homme ont montré que le CD146 est exprimé dans le placenta par les trophoblastes intermédiaires (ou extravilloux) mais n'est pas détecté dans les syncytiotrophoblastes et les cytotrophoblastes [188]. D'un point de vue fonctionnel, la forme soluble de CD146 a été identifiée comme étant un régulateur de la migration trophoblastique et joue un rôle dans le développement vasculaire du placenta [189]. Dans le but de compléter ces travaux, nous avons entrepris avec le groupe du Pr Sophie GIL de caractériser l'expression du CD146 dans des extraits de villosités placentaires chez l'humain. Les données ont montré que l'expression en ARNm est stable à différentes périodes gestationnelles alors que l'expression protéique de la forme membranaire augmente. Cette augmentation est associée à une augmentation de l'expression d'autres membres de la famille PlGF/VEGF et de son signalosome, à savoir, le PlGF, le VEGF-R1 ou encore la préséniline-1. Ces résultats peuvent s'interpréter comme une signature pro-angiogénique, en accord avec le développement vasculaire placentaire au cours du 3^{ème} trimestre. Afin de caractériser le profil d'expression placentaire du CD146 chez la Souris, nous avons choisi de réaliser des expériences

⁸⁷Lehmann *et al.*, 1987, Cancer Research

¹⁸¹Luca *et al.*, 1993, Melanoma Research

¹⁸²Xie *et al.*, 1997, Cancer Research

¹⁸³Lei *et al.*, 2015, Cancer Cell International

¹⁸⁴Weninger *et al.*, 2000, Journal of Investigative Dermatology

¹⁸⁵Bardin *et al.*, 2003, Thrombosis and Haemostasis

¹⁸⁶Bardin *et al.*, 2006, Inflammatory Bowel Diseases

¹⁸⁷Neidhart *et al.*, 2001, Arthritis and Rheumatism

¹⁸⁸Shih, 1999, The Journal of Pathology

¹⁸⁹Kaspi *et al.*, 2013, Angiogenesis

de qRT-PCR et de Western blot à trois stades de gestation (GD15, GD17, GD20). En qRT-PCR, les analyses révèlent, qu'aux trois stades de gestation étudiés, les ARNm codant le CD146 sont détectés dans le placenta, sans variation significative dans leur expression même si une augmentation est observée au stade GD20. En Western blot, les taux protéiques des deux formes de CD146 ont été quantifiés. Les données montrent que l'expression de la forme membranaire de CD146 augmente progressivement de GD15 à GD20, et que la forme soluble de CD146 est significativement moins exprimée que la forme membranaire dans le placenta aux stades GD17 et GD20. Ces résultats sont très comparables aux profils d'expression obtenus chez l'humain et nous ont conforté dans le choix de ce modèle murin pour l'étude des effets de l'alcoolisation *in utero* sur l'expression du CD146. De plus, la forme soluble étant retrouvée dans la circulation sanguine chez la femme enceinte [189], nous avons voulu savoir si elle pouvait être également retrouvée dans la circulation fœtale. Nous avons donc réalisé des dosages de sCD146 dans le plasma de fœtus et de souriceaux à différents stades du développement. Les résultats montrent que les taux de sCD146 sont plus élevés dans le sang céphalique aux stades fœtaux par rapport au stade P2. Ces résultats suggèrent, au moins en partie, que le sCD146 présent dans la circulation fœtale pourrait avoir une origine placentaire. Afin de tester cette hypothèse, des études de perfusion placentaire chez l'humain vont être entreprises en collaboration avec le Pr Sophie GIL.

Caractérisation du profil d'expression cérébrale du CD146

Dans le cerveau de souris, le CD146 est exprimé par les cellules endothéliales et par les péricytes [190], et orchestre le développement de la barrière hémato-encéphalique [191]. Dans le cortex cérébral, le profil d'expression de CD146 n'étant pas connu, nous avons donc réalisé, comme pour le placenta, des expériences de qRT-PCR et de Western blot. Des analyses prénatales (GD15, GD17, GD20) et postnatales (P2, P5, P10, P15, P20) ont donc pu être effectuées. Les données montrent que les ARNm codant le CD146 sont détectés à tous les stades étudiés et que les taux ne varient pas. Concernant les taux protéiques, en comparant la moyenne de tous les stades prénataux et de tous les stades postnataux, on constate que l'expression de la forme membranaire de CD146 est diminuée en postnatal. Le CD146 est donc une protéine dont l'expression est significative au cours du neurodéveloppement, et en particulier, dans une

¹⁸⁹Kaspi *et al.*, 2013, Angiogenesis

¹⁹⁰Bardin *et al.*, 2001, Blood

¹⁹¹Chen *et al.*, 2017, PNAS

période où la neurogenèse et l'angiogenèse sont importantes. De plus, le sondage de la base de données *Brainspan* montre que l'expression, en terme de transcrit, dans le cerveau est faible. Elle augmente à partir de la 27^{ème} semaine post-conception et persiste dans ce sens en postnatal (**Figure 27**). En accord avec cette analyse, nos résultats obtenus par Western blot révèlent que, pour une même quantité de protéine déposée, le CD146 est beaucoup plus fortement exprimé dans le placenta que dans le cerveau (**Figure 28**). Même si le rôle de CD146 dans le développement du système nerveux central (SNC) n'a pas été étudié de façon détaillée, une étude a montré, chez la Souris, que la délétion conditionnelle du CD146 dans le système nerveux diminue l'appétit, l'activité locomotrice et l'apprentissage spatial [192]. Le CD146 présenterait donc une fonction dans le développement du système nerveux des mammifères.

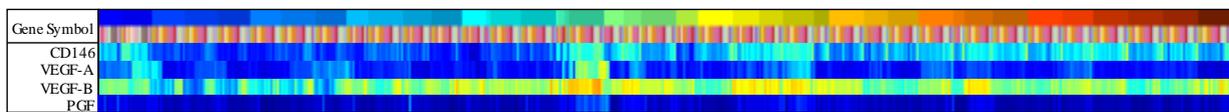


Figure 27 : Carte *Brainspan* comparant les profils d'expression de CD146, VEGF-A, VEGF-B et PGF dans le cerveau humain à partir de la huitième semaine de gestation (SG8) jusqu'à l'âge adulte. D'après <http://www.brainspan.org>.

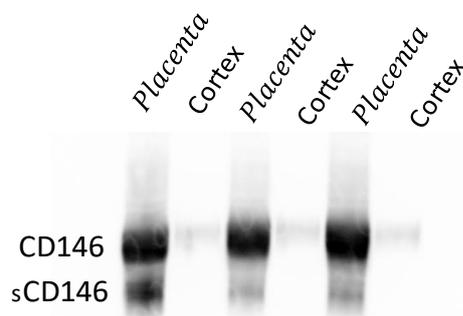


Figure 28 : Visualisation, par Western blot, de l'expression du CD146 et de sa forme soluble, le sCD146, dans le placenta et dans le cortex cérébral à E20. La quantité de protéines déposée dans chacun des puits est identique.

Alcoolisation foetale et impact sur l'expression placentaire et corticale de CD146 et du signalosome qui lui est associé

L'alcoolisation *in utero* impacte l'expression de différents marqueurs protéiques de l'intégrité placentaire et de membres de la famille du VEGF [67, 193], comme le PlGF. Hormis le PlGF, le placenta exprime un co-récepteur de VEGF-R2, le CD146. En effet, cette protéine interagit

⁶⁷Lecuyer *et al.*, 2017, Acta Neuropathologica Communications

⁷⁷Jiang *et al.*, 2012, Blood

¹⁹²Tu *et al.*, 2013, PLoS One

¹⁹³Cai *et al.*, 2011, Molecular Cell

directement avec le VEGF-R2 dans les cellules endothéliales [77]. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'alcoolisation *in utero* puisse perturber l'expression de CD146. Afin de tester cette hypothèse, nous avons recherché une altération de l'expression placentaire et corticale de la protéine CD146 au stade E20 suite à un traitement *in utero* à l'alcool. Dans le placenta, les études de Western blot ont montré que l'expression de sCD146 diminue drastiquement chez les souris gestantes traitées à l'alcool alors que les expériences de qRT-PCR ne montrent pas de différence significative. Cette apparente contradiction peut s'expliquer par les travaux de Duan et collaborateurs qui révèlent que sCD146 est obtenue par un clivage de la forme membranaire impliquant des métalloprotéinases (MMP) ou des *a disintegrin and metalloprotease* (ADAM ; [95, 194]). Il serait donc intéressant de rechercher l'effet de l'alcoolisation *in utero* sur l'activité de ces protéases au niveau placentaire. Contrairement au placenta, les études de Western blot ont mis en évidence une augmentation de sCD146 dans le cerveau fœtal suite à une alcoolisation *in utero* alors que, à nouveau, l'expression en ARNm codant CD146 n'est pas modifiée. Les effets opposés de l'alcool sur l'expression de sCD146 au niveau du placenta et au niveau du cortex cérébral pourraient s'expliquer de différentes manières. Il pourrait s'agir d'une régulation locale de sCD146 avec une action directe de l'alcool sur le cerveau fœtal ou l'augmentation de l'expression corticale de sCD146 pourrait résulter d'un mécanisme de compensation suite à la forte diminution de son expression placentaire. Cette dernière hypothèse serait en faveur de l'existence d'un axe Placenta-Cerveau et plusieurs éléments viennent l'étayer. Tout d'abord, la comparaison des niveaux d'expression de sCD146 par Western blot montre que, comme pour le PlGF, le sCD146 est très majoritairement placentaire. D'autre part, des travaux ont démontré, chez l'adulte, l'existence de sCD146 circulant à la fois au niveau sanguin et dans le liquide céphalorachidien [194]. D'un point de vue mécanistique, le CD146 forme avec l'angiostatine, le VEGF-R1, le VEGF-R2 et la préséniline-1 un signalosome complexe dans les cellules endothéliales [95]. Sachant qu'une exposition *in utero* à l'alcool entraîne une perturbation de l'expression placentaire et corticale de sCD146, nous avons voulu savoir si les éléments de ce signalosome étaient également impactés. Dans le placenta, les expressions de VEGF-R1 et de VEGF-R2 sont altérées par l'exposition *in utero* à l'alcool. Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment obtenus dans une étude réalisée au Laboratoire [67]. L'expression de la préséniline-1 est également modifiée suite à

⁶⁷Lecuyer *et al.*, 2017, Acta Neuropathologica Communications

⁷⁷Jiang *et al.*, 2012, Blood

⁹⁵Stalin *et al.*, 2016, Cardiovascular Research

¹⁹⁴Duan *et al.*, 2013, Scientific Reports

l'alcoolisation *in utero*. Dans le cerveau des fœtus, et en concordance avec ce qui a été précédemment décrit [67], l'expression de VEGF-R1 diminue fortement lors d'une exposition prénatale à l'alcool. De façon intéressante et contrairement à ce qui a été observé dans le placenta, l'alcool induit une augmentation de l'expression de la préséniline-1. La préséniline-1 est une protéase qui intervient dans le clivage intracellulaire de CD146. Il serait donc intéressant de rechercher si l'augmentation de son expression est associée à une augmentation de son activité suite à une exposition *in utero* à l'alcool. En conclusion, nos résultats indiquent que l'exposition *in utero* à l'alcool perturbe le signalosome de CD146, avec un profil Placenta-Cerveau spécifique.

Enfin, une étude a récemment démontré un désordre du développement vasculaire cérébral chez des souris invalidées pour le gène *pgf* [66]. En effet, Luna et collaborateurs ont observé dans le cerveau des fœtus $PGF^{-/-}$ une désorganisation des microvaisseaux corticaux comme décrit chez la Souris et l'Homme exposés *in utero* à l'alcool. Cette observation est associée à une augmentation de la vulnérabilité des souris adultes $PGF^{-/-}$ à l'accident vasculaire cérébral [66]. De même, dans une autre étude, Croy et collaborateurs ont montré que le gène *pgf* jouait un rôle important dans le développement vasculaire de la rétine [199]. Par ailleurs, un lien fonctionnel impliquant le PlGF avait été établi entre les anomalies placentaires et les troubles de l'angiogenèse constatés dans le cerveau fœtal [67]. En effet, la répression placentaire du PlGF conduit à des anomalies de l'angiogenèse cérébrale chez le fœtus à E20. Afin de rechercher l'existence d'un tel lien pour le CD146, nous avons entrepris de rechercher l'impact d'une invalidation placentaire du CD146 par électroporation *in utero* de plasmides CD146 CRISPR-Cas9 chez la Souris. Les résultats ont mis en évidence que la répression placentaire du CD146 se traduit par une désorganisation vasculaire cérébrale comme observée chez les fœtus exposés à l'alcool. Ces résultats renforcent donc la contribution des membres de la famille VEGF/PlGF dans le contrôle de l'angiogenèse cérébrale du fœtus. Comme effectué pour le PlGF [67], il serait intéressant de réaliser une surexpression du CD146 au niveau placentaire afin de rechercher une potentielle correction des effets de l'alcool sur les troubles de l'angiogenèse cérébrale. L'ensemble de ces données conforte l'existence d'une signature

⁶⁶Luna *et al.*, 2016, Molecular Human Reproduction

⁶⁷Lecuyer *et al.*, 2017, Acta Neuropathologica Communications

¹⁹⁹Kay *et al.*, 2017, Developmental Dynamics

angiogénique pour le diagnostic précoce d'atteintes cérébrales induites par une alcoolisation *in utero*.

Approche transcriptomique sans *a priori*

Les travaux réalisés au Laboratoire ont montré qu'il existait un lien étroit entre le placenta et le cortex fœtal en terme de contrôle de l'angiogenèse [67, 160, 200]. En particulier, l'examen de placentas alcoolisés et non alcoolisés chez l'Homme et la Souris révèle une forte corrélation entre les défauts vasculaires placentaires et cérébraux [67]. Bien qu'il soit évident que le placenta et le cerveau possèdent deux transcriptomes différents, il apparaît donc que des liens fonctionnels existent entre les deux organes. Dans le but de rechercher l'impact de l'alcoolisation *in utero* sur la signature « Placenta-Cerveau », une analyse transcriptomique comparative a été initiée. Dans cette optique, nous avons mis en place le protocole expérimental suivant (**Figure 29**). Huit souris gestantes ont reçu, du 15^{ème} au 20^{ème} jour de gestation, une injection quotidienne en sous-cutanée de NaCl ou d'éthanol dilué volume à volume dans du NaCl (quatre souris par groupe). A E20, les placentas et les cerveaux fœtaux ont été prélevés et les ARN totaux extraits. Les ADNc ont ensuite été synthétisés à partir de l'ARN total, marqués avec un fluorophore cyanine 3 (Cy3) puis hybridés sur une puce pour *microarray* contenant 44306 sondes couvrant l'ensemble du transcriptome murin (Agilent V2 mouse XM). Enfin, le signal fluorescent a été lu à l'aide de l'équipement *SureScan Microarray Scanner*. Dans le but de comparer l'impact de l'alcoolisation *in utero* sur la signature transcriptomique « Placenta-Cerveau », une analyse statistique a été effectuée à l'aide du logiciel *GeneSpring* (V14.9.1, Agilent).

⁶⁷Lecuyer *et al.*, 2017, Acta Neuropathologica Communications

¹⁶⁰Jégou *et al.*, 2012, Annals of Neurology

²⁰⁰Sautreuil *et al.*, 2019, Médecine/Sciences

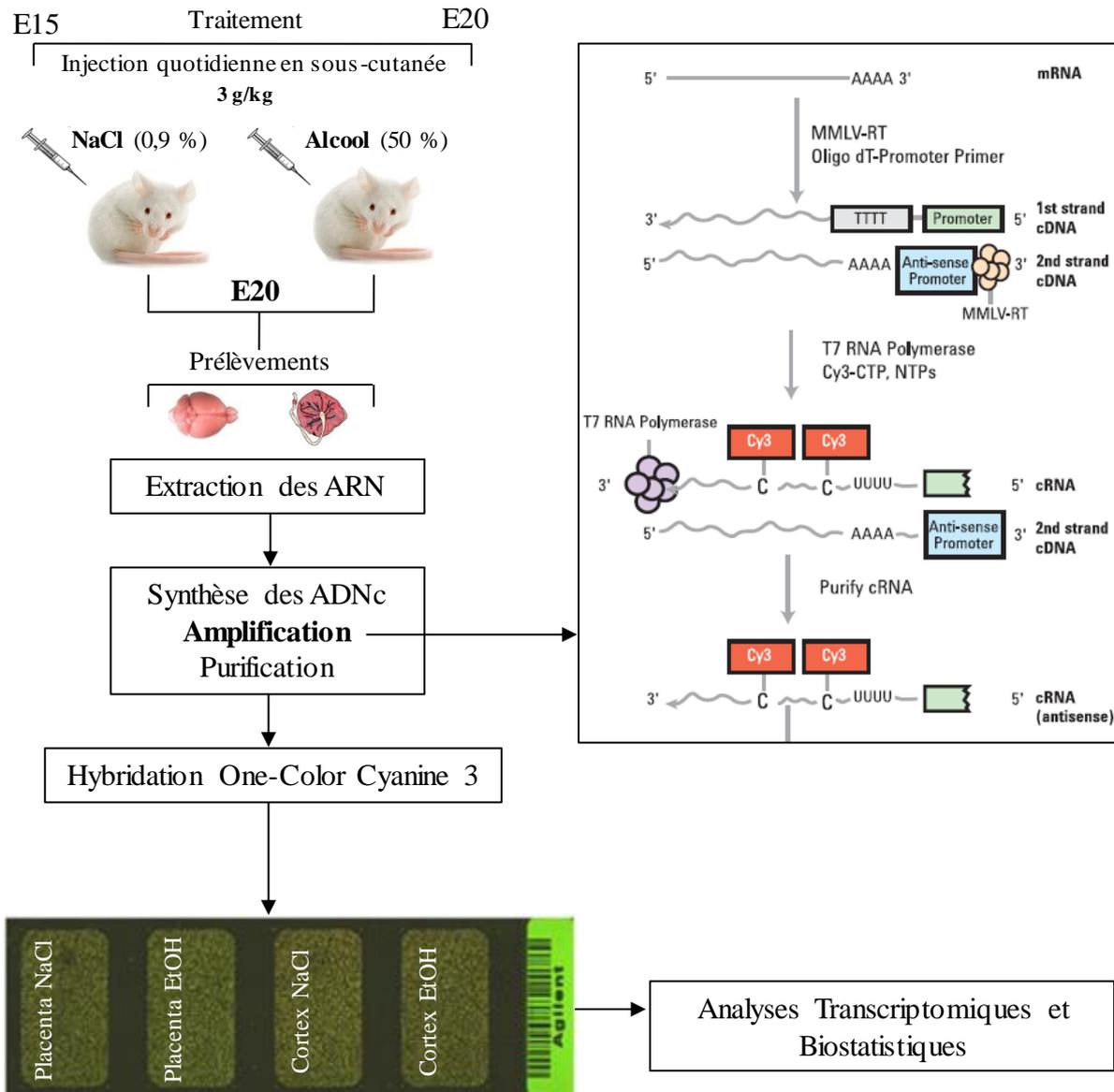


Figure 29 : Protocole expérimental de l'approche transcriptomique comparative « Placenta-Cerveau ». Des souris gestantes sont séparées en deux groupes. Du 15^e au 20^e jour de gestation, le groupe « Contrôle » reçoit une injection quotidienne en sous-cutanée de NaCl 0,9% et le groupe « Alcool », une injection d'éthanol dilué à 50% dans du NaCl. La dose injectée est de 3g/kg. A E20, les cerveaux fœtaux et les placentas associés sont prélevés. Les échantillons sont ensuite préparés pour l'analyse transcriptomique. Cy3 : Cyanine 3 ; MMLV-RT : *moloney murine leukemia virus reverse transcriptase* ; CTP : cytidine tri phosphate ; NaCl : chlorure de sodium.

Dans un premier temps, une analyse comparée des transcrits différemment exprimés entre le cortex fœtal et le placenta au stade E20 a été réalisée en condition « Contrôle » (**Figure 30**). Sur les 44306 sondes géniques, 12304 sont significativement exprimées différemment entre le cortex fœtal et le placenta. En particulier, 6066 et 6238 sondes sont respectivement sous- et sur-exprimées dans le cortex par rapport au placenta (**Figure 30**). Ces données constituent la signature inter-organes dans la condition « Contrôle ». Elles montrent, comme l'on pouvait s'y attendre, que les transcrits entre les deux organes sont très différents ; le placenta n'est pas du cortex.

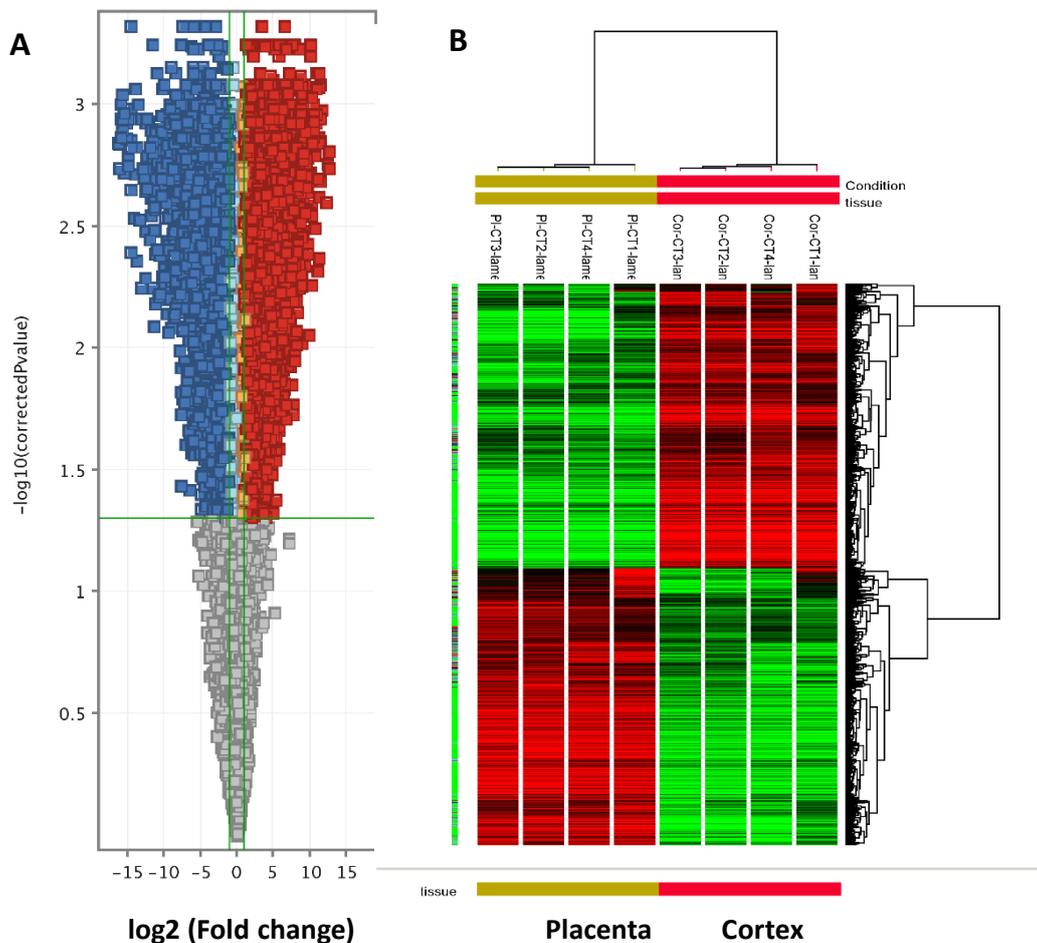


Figure 30 : Identification des transcrits différemment exprimés entre le cortex et le placenta à E20 dans le groupe « Contrôle ». (A) *Volcano plot* visualisant les transcrits significativement différemment exprimés d'au moins 2 fois entre le cortex par rapport au placenta à E20. L'analyse statistique a été effectuée après élimination des *spikes* et des sondes contrôles (*flag*). *t* test avec correction Benjamini Hochberg ; $\alpha < 0,05$; bruit de fond < 50 . (B) Représentation par regroupement hiérarchique des 12304 transcrits significativement différemment exprimés entre le cortex et le placenta à E20.

En condition « Alcool », 12910 sondes géniques sont significativement différemment exprimées entre le cortex fœtal et le placenta. Sur ces 12910 sondes géniques, 6326 et 6584 sont respectivement sous- et sur-exprimées dans le cortex par rapport au placenta (**Figure 31**). Ces données constituent la signature « Alcool » inter-organes et montrent que, quantitativement, l'alcool ne modifie pas la proportion de sondes géniques différemment exprimées entre les deux organes.

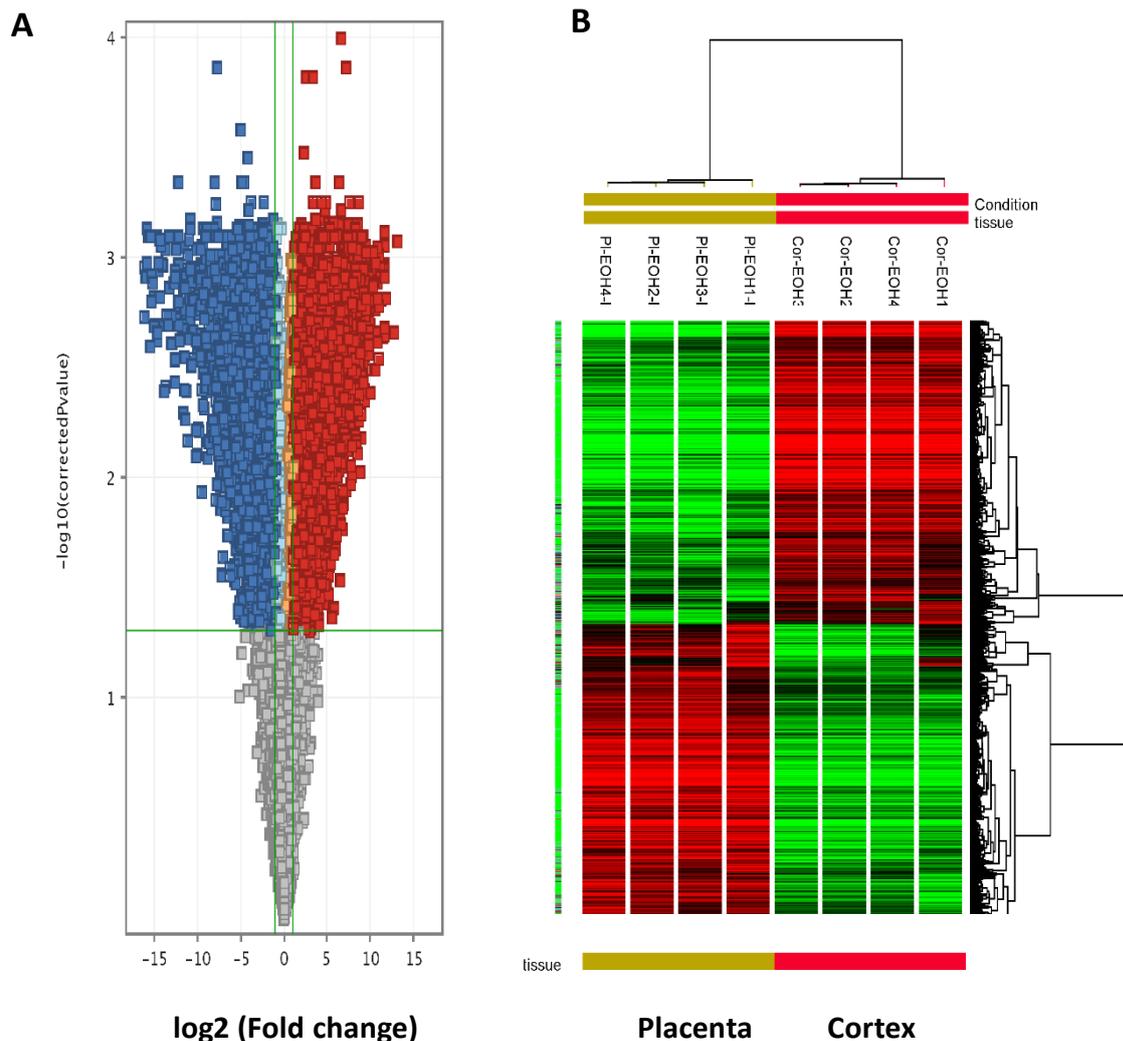


Figure 31 : Identification des transcrits différemment exprimés entre le cortex et le placenta à E20 dans le groupe « Alcool ». (A) *Volcano plot* visualisant les transcrits significativement différemment exprimés d’au moins 2 fois entre le cortex et le placenta à E20 après élimination des *spikes* et des sondes contrôles (*flag*). *t* test avec correction Benjamini Hochberg ; $\alpha < 0,05$; bruit de fond < 50 . (B) Représentation par regroupement hiérarchique des 12910 transcrits significativement différemment exprimés entre le cortex et le placenta à E20.

Dans un second temps, une analyse comparée des sondes géniques constitutives des deux signatures a été effectuée (**Figure 32**). Concernant les sondes significativement sous-exprimées d'au moins 2 fois dans le cortex par rapport au placenta, la plupart des sondes sont retrouvées dans les deux groupes (81,73%). Toutefois, 493 sondes géniques sont spécifiquement présentes dans le groupe « Contrôle » alors que 753 sont spécifiquement sous-exprimées d'au moins 2 fois entre le cortex et le placenta dans le groupe « Alcool » (**Figure 32A**). De même, un diagramme de Venn montre que 83,54% des sondes géniques significativement sur-exprimées d'au moins 2 fois dans le cortex par rapport au placenta le sont dans les deux groupes mais 402 sondes géniques sont spécifiquement présentes dans le groupe « Contrôle » alors que 748 sont spécifiquement sur-exprimées d'au moins 2 fois entre le cortex et le placenta dans le groupe « Alcool » (**Figure 32B**).

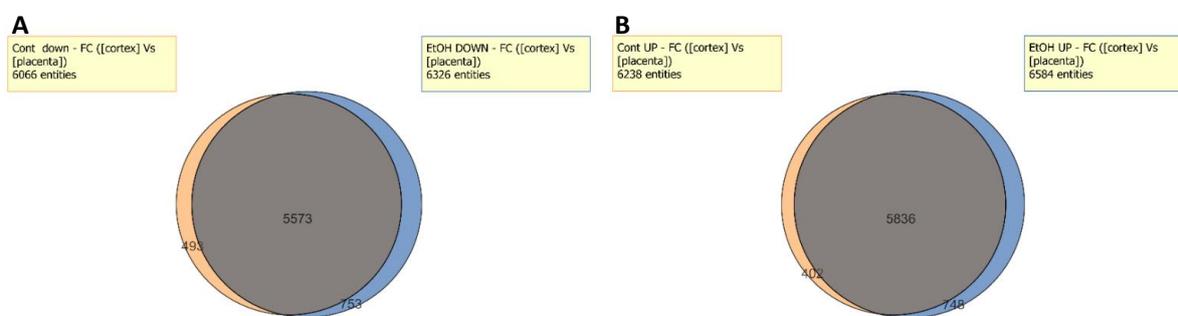


Figure 32 : Analyse comparée de l'effet d'une alcoolisation *in utero* sur le nombre de sondes géniques significativement sous et surexprimées entre le cortex fœtal et le placenta à E20. (A) Diagramme de Venn visualisant le nombre de sondes sous-exprimées dans le cerveau *versus* placenta à la fois chez les individus des groupes « Contrôle » et « Alcool » (5573), le nombre de sondes géniques sous-exprimées entre le cortex *versus* placenta uniquement dans le groupe « Contrôle » (493) et le groupe « Alcool » (753). (B) Diagramme de Venn visualisant le nombre de sondes surexprimées entre le cortex *versus* placenta à la fois chez les individus des groupes « Contrôle » et « Alcool » (5836), le nombre de sondes géniques surexprimées entre le cerveau *versus* placenta uniquement dans le groupe « Contrôle » (402) et le groupe « Alcool » (748).

Les résultats des études ciblées réalisées à la fois chez l'humain et la Souris ont révélé que le système vasculaire était particulièrement impacté par l'exposition *in utero* à l'alcool et qu'il existait une corrélation fonctionnelle témoignant d'une dysfonction « Placenta-Cerveau » [67, 200]. Au niveau moléculaire, les acteurs de l'angiogenèse comme le PlGF et le CD146 apparaissent comme des facteurs circulants pouvant être à l'origine de cette communication inter-organes. Afin de cribler les données de transcriptomique sous l'angle de l'angiogenèse,

⁶⁷Lecuyer *et al.*, 2017, Acta Neuropathologica Communications

²⁰⁰Sautreuil *et al.*, 2019, Médecine/Sciences

nous avons donc entrepris une analyse GO (*Gene Ontology*) par extraction des listes de gènes associées aux termes GO *blood vessel morphogenesis* et *vasculature development*. Cette extraction a généré une liste de 960 gènes. La comparaison des listes de gènes différemment impactés entre les groupes « Contrôle » et « Alcool » avec la liste de gènes GO *angiogenesis* indique que 326 gènes impliqués dans le contrôle de l'angiogenèse sont spécifiquement sous-exprimés dans le cortex par rapport au placenta dans le groupe « Contrôle ». De même, 350 gènes impliqués dans le contrôle de l'angiogenèse sont spécifiquement sous-exprimés entre le cortex et le placenta dans le groupe « Alcool » (**Figure 33A**). Cette même analyse a été reproduite avec les gènes spécifiquement sur-exprimés entre le cortex et le placenta dans les groupes « Contrôle » (178 gènes) et « Alcool » (198 gènes ; **Figure 33B**). Ces listes de gènes sont, à ce jour, confidentielles et la prochaine étape va consister à valider par qRT-PCR les gènes potentiellement associés à des facteurs circulants ou des récepteurs afin de déterminer leur potentielle valeur en tant que biomarqueur. A terme, les protéines identifiées pourraient venir compléter une signature de la dysfonction angiogénique « Placenta-Cerveau » dans un contexte d'alcoolisation *in utero*. A ce jour, l'analyse GO a été ciblée « angiogenèse » mais la même stratégie pourrait être déclinée à d'autres processus pour lesquels l'alcool est un agent interférent tels que l'inflammation [201] ou le stress [202], par exemple.

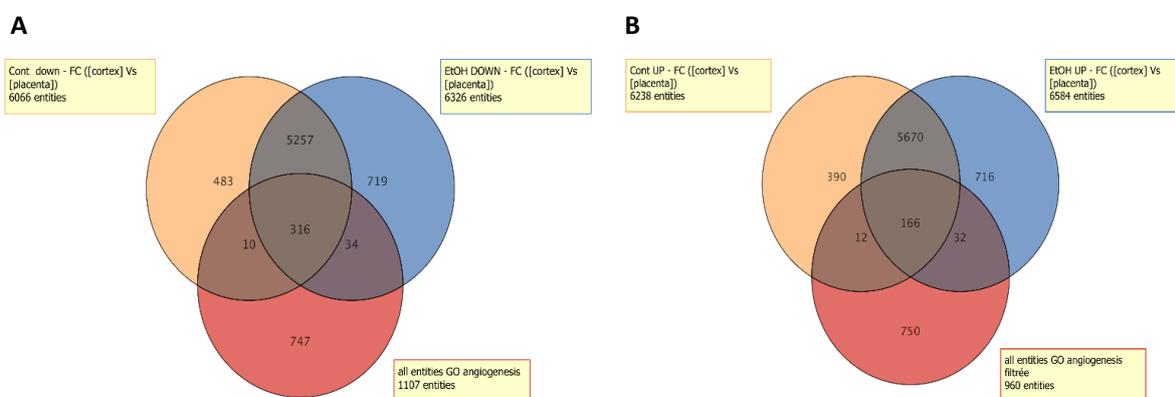


Figure 33 : Analyse GO *angiogenesis* des sondes géniques significativement sous et sur-exprimées entre le cerveau fœtal et le placenta des groupes « Contrôle » et « Alcool » à E20. (A) Diagramme de Venn visualisant le nombre de gènes associées aux termes GO *angiogenesis* et significativement sous-exprimés entre le cerveau et le placenta chez les individus du groupe « Contrôle ». (B) Diagramme de Venn visualisant le nombre de gènes associées aux termes GO *angiogenesis* et significativement sur-exprimés entre le cerveau et le placenta chez les individus du groupe « Alcool ».

²⁰¹Tarasaki et Schwarz, 2016, Journal of Neuroimmune Pharmacology

²⁰²Lan *et al.*, 2017, Neuroscience

En conclusion, les approches mécanistiques et fonctionnelles ciblées sur des facteurs angiogéniques tels que le PlGF et le CD146 confortent l'existence d'une interaction fonctionnelle entre le placenta et le cerveau fœtal. La dérégulation de ces facteurs par l'alcoolisation *in utero* peut constituer une source de biomarqueurs d'atteintes du développement cérébral. Cette nouvelle génération de biomarqueurs serait précieuse pour le diagnostic précoce des enfants dont les troubles vont se révéler progressivement durant leur trajectoire développementale. Le couplage de l'approche transcriptomique avec les données mécanistiques et fonctionnelles obtenues depuis une douzaine d'années par une approche ciblée permettrait d'étoffer la signature « Alcool » de la dysfonction « Placenta-Cerveau ».

Références bibliographiques

- [1] Smith JC., Slack JMW. (1983). Dorsalization and neural induction: properties of the organizer in *Xenopus Laevis*. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. 78:299-317
- [2] Harland RM. (1994). Neural induction in *Xenopus*. *Current Opinion in Genetics and Development*. 4:543-549
- [3] Wilson PA., Hemmati-Brivanlou A. (1995). Induction of epidermis and inhibition of neural fate by Bmp-4. *Nature*. 376:331-3
- [4] Sasai Y., Steinbeisser H., De Robertis EM. (1995). Regulation of neural induction by the Chd and Bmp-4 antagonistic patterning signals in *Xenopus*. *Nature*. 376:333-6
- [5] Smith JL., Schoenwolf GC. (1997). Neurulation: Coming to closure. *Trends in Neurosciences*. 20:510:517
- [6] Pulikkunnel ST., Thomas SV. (2005). Neural tube defects: pathogenesis and folate metabolism. *Journal of the Association of Physicians of India*. 53:127-35
- [7] www.embryologie.ch
- [8] Florio M., Huttner WB. (2014). Neural progenitors, neurogenesis and the evolution of the neocortex. *Development*. 141:2182-94
- [9] Rakic P. (1972). Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *Journal of Comparative Neurology*. 145:61-83
- [10] Götz M., Hartfuss E., Malatesta P. (2002). Radial glial cells as neuronal precursors: a new perspective on the correlation of morphology and lineage restriction in the developing cerebral cortex of mice. *Brain Research Bulletin*. 57:777-788
- [11] Anthony TE., Klein C., Fishell G., Heintz N. (2004). Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron*. 41:881-890
- [12] Romero DM., Bahi-Buisson N., Francis F. (2018). Genetics and mechanisms leading to human cortical malformations. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 76:33-75
- [13] Hatten ME., Mason CA. (1990). Mechanisms of glial-guided neuronal migration *in vitro* and *in vivo*. *Experientia*. 46:907-916
- [14] Rakic P. (1990). Principles of neural cell migration. *Experientia*. 46:882-891
- [15] Corbin JG., Nery S., Fishell G. (2001). Telencephalic cells take a tangent: non-radial migration in the mammalian forebrain. *Nature Neuroscience*. 4:1177-1182
- [16] Marín O., Rubenstein JL. (2003). Cell migration in the forebrain. *Annual Review of Neuroscience*. 26:441-483

- [17] Noctor SC., Martinez-Cerdeno V. Ivic L., Kriegstein AR. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nature Neuroscience*. 7:164-144
- [18] Kosodo Y., Roper K., Haubensak W., Marzesco AM., Corbeil D., Huttner WB. (2004). A symmetric distribution of the apical plasma membrane during neurogenic divisions of mammalian neuroepithelial cells. *Journal of the European Molecular Biology Organization*. 23:2314-2324
- [19] Bielle F., Griveau A., Narboux-Neme N., Vigneau S., Sigrist M., Arber S., Wassef M., Pierani A. (2005). Multiple origins of Cajal-Retzius cells at the border of the developing pallium. *Nature Neuroscience*. 8:1002-1012
- [20] D'Arcangelo G., Miao GG., Chen SC., Soares HD., Morgan JL., Curran T. (1995). A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature*. 374:719-723
- [21] Heuer H., Christ S., Friedrichsen S., Brauer D., Winckler M., Baueer K., Raivich G. (2003). Connective tissue growth factor: a novel marker of layer VII neurons in the rat cerebral cortex. *Neuroscience*. 119:43-52
- [22] Angevine JB., Sidman RI. (1961). Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature*. 192:766-768
- [23] McConnell SK. (1988). Fates of visual cortical neurons in the ferret after isochronic and heterochronic transplantation. *Journal of Neuroscience*. 8:945-974
- [24] Buono KD., Goodus MT., Guardia Clausi G., Jiang Y., Loporchio D., Levison SW. (2015). Mechanisms of mouse neural precursor expansion after neonatal hypoxia-ischemia. *Journal of Neuroscience*. 35:8855-8865
- [25] Cameron R.S., Rakic P. (1991). Glial cell lineage in the cerebral cortex: a review and synthesis. *Glia*. 4:124-137
- [26] Noden DM. (1989). Embryonic origins and assembly of blood vessels. *The American Review of Respiratory Disease*. 140:1097-1103
- [27] Risau W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 386:671-674
- [28] Padget DH. (1948). The circle of Willis: Its embryology and anatomy. *Dandy, W.E., Ed., Intracranial Arterial Aneurysms, Chapter III, Comstock Publishing, New York, 67-90*
- [29] Van Overbeeke JJ., Hillen B., Tulleken CA. (1991). A comparative study of the circle of Willis in fetal and adult life. The configuration of the posterior bifurcation of the posterior communicating artery. *Journal of Anatomy*. 176:45-54

- [30] Van der Grond J., Van Raamt AF., Van der Graaf Y., Mali WP., Bisschops RH. (2004). A fetal circle of Willis is associated with a decreased deep white matter lesion load. *Neurology*. 63:1452-1456
- [31] Dijke P., Arthur HM. (2007). Extracellular control of TGFbeta signaling in vascular development and disease. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 8:857-869
- [32] Carmeliet P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature medicine*. 6:389-395
- [33] Burri PH., Hluschuk R., Djonov V. (2004). Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. *Developmental Dynamics*. 231:474-488
- [34] Blanco R. Gerhardt H. (2013). VEGF and Notch in tip and stalk cell selection. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 3:a006569
- [35] Folkman J. (2003). Fundamental concepts of the angiogenic process. *Current Molecular Medicine*. 3:643-651
- [36] Siemerink MJ., Klaassen I., Van Noorden CJF., Schlingemann RO. (2013). Endothelial tip cells in ocular angiogenesis. Potential Target for anti-angiogenesis therapy. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 61:101-115.
- [37] Jakobsson L., Franco CA., Bentley K., Collins RT., Ponsioen B., Aspalter IM., Rosewell I., Busse M., Thurston G., Medvinsky A., Schulte-Merker S., Gerhardt H. (2010). Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nature Cell Biology*. 12:943-953
- [38] Blanco R., Gerhardt H. (2013). VEGF and notch in tip and stalk cell selection. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 3:a006569
- [39] Carmeliet P., Jain RK. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 473:298-307.
- [40] Djonov V., Baum O., Burri PH. (2003). Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis. *Cell and Tissue Research*. 314:107-117
- [41] Mukouyama YS., Shin D., Britsch S., Taniguchi M., Anderson DJ. (2002). Sensory nerves determine the pattern of arterial differentiation and blood vessel branching in the skin. *Cell*. 109:696-705
- [42] Mukouyama YS., Gerber HP., Ferrara N., Gu C., Anderson DJ. (2005). Peripheral nerve-derived VEGF promotes arterial differentiation via neuropiline 1-mediated positive feedback. *Development*. 132:941-952
- [43] Andreone BJ., Lacoste B., Gu C. (2015). Neuronal and vascular interactions. *The Annual Review of Neuroscience*. 38:24-46

- [44] Carmeliet P., Tessier-Lavigne M. (2005). Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature*. 436:193-200
- [45] Celin AR., Rapacioli M., Gonzalez MA., Ballarin VL., De Plazas SF., Lopez-Costa JJ., Flores V. (2015). Temporal-spatial correlation between angiogenesis and corticogenesis in the developing chick optic tectum. *PLoS One*. 10:e0116343
- [46] Li S., Haigh K., Haigh JJ., Vasudevan A. (2013). Endothelial VEGF sculpts cortical cytoarchitecture. *Journal of Neuroscience*. 33:14809-14815
- [47] Cuzon VC, Yeh PW, Cheng Q, Yeh HH. (2016). Ambient GABA promotes cortical entry of tangentially migrating cells derived from the medial ganglionic eminence. *Cerebral Cortex*. 16:1377–1388
- [48] Won C., Lin Z. Kumar TP., Li S., Ding L., Elkhali A., Szabo G., Vasudevan A. (2013). Autonomous Vascular networks synchronize GABA neuron migration in the embryonic forebrain. *Nature Communication*. 4:2149
- [49] Kessaris N., Fogarty M., Lannarelli P., Grist M., Wegner M., Richardson WD. (2006). Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nature Neuroscience*. 9:173-179
- [50] Tsai HH., Niu J., Munji R., Davalos D., Chang J., Zhang H., Tien AC., Kuo CJ., Chan JR., Daneman R., Fancy SP. (2016). Oligodendrocyte precursors migrate along vasculature in the developing nervous system. *Science*. 351:379-384
- [51] Dejana E., Betsholtz C. (2016). Oligodendrocytes follow blood vessel trails in the brain. *Science*. 351:341-342
- [52] Snapyan M., Lemasson M., Brill MS., Blais M., Massouh M., Ninkovic J., Gravel C., Berthod F., Götz M., Barker PA., Parent A., Saghatelian A. (2009). Vasculature guides migrating neuronal precursors in the adult mammalian forebrain via Brain-Derived Neurotrophic Factor signaling. *Journal of Neuroscience*. 29:4172-88
- [53] Carmeliet P., Jain RK. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 407:249-257
- [54] Shibuya M. (2008). Vascular endothelial growth factor-dependent and -independent regulation of angiogenesis. *BMB Reports*. 41:278-86
- [55] Senger DR., Galli SJ., Dvorak AM., Perruzzi CA., Harvey VS., Dvorak HF. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 219:983-5

- [56] Ferrara N., Henzel WJ. (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 161:851-8
- [57] Plouët J., Schilling J. Gospodarowicz D. (1989). Isolation and characterization of newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *Journal of the European Molecular Biology Organization*. 8:3801-6
- [58] Harper SJ., Bates DO. (2008). VEGF-A splicing the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nature Reviews Cancer*. 8:880-887
- [59] Carmeliet P., Ferreira V., Breier G., Pollefeyt S., Kieckens L., Gertsenstein M., Fahrig M., Vandenhoek A., Harpal K., Eberhardt C., Declercq C., Pawling J., Moons L., Collen D., Risau W., Nagy A. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*. 380:435-9
- [60] McColl BK., Paavonen K., Karnezis T., Harris NC., Davydova N., Rothacker J., Nice EC., Harder KW., Roufail S., Hibbs ML., Rogers PA., Alitalo K., Stacker SA., Achen MG. (2007). Proprotein convertases promote processing of VEGF-D, a critical step for binding the angiogenic receptor VEGFR-2. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*. 21:1088-1098
- [61] Pages G., Pouyssegur J. (2005). Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene: a concert of activating factors. *Cardiovascular Research*. 65:564-573
- [62] De Falco S. (2012). The discovery of placenta growth factor and its biological activity. *Experimental & Molecular Medicine*. 44:1-9
- [63] Fischer C., Mazzone M., Jonckx B., Carmeliet P. (2008). FLT1 and its ligand VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? *Nature Reviews Cancer*. 8:942-956.
- [64] Lecarpentier E., Tsatsaris V. (2016). Angiogenic balance (sFlt-1/PlGF) and preeclampsia. (2016). *Annales d'Endocrinologie*. 77:97-100
- [65] Freitas-Andrade M., Carmeliet P., Charlebois C., Stanimirovic D., Moreno MJ. (2011). PlGF knockout delays brain vessel growth and maturation upon systemic hypoxic challenge. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 32:663-75
- [66] Luna RL. Kay VR., Rätsep MT., Khalaj K., Bidarimath M., Peterson N., Carmeliet P., Jin A., Croy BA. (2016). Placental growth factor deficiency is associated with impaired cerebral vascular development in mice. *Molecular Human Reproduction*. 22:130-142
- [67] Lecuyer M., Laquerrière A., Bekri S., Lesueur C., Ramdani Y., Jégou S., Uguen A., Marcorelles P., Marret S., Gonzalez BJ. (2017). PLGF, a placental marker of fetal brain defects after in utero alcohol exposure. *Acta Neuropathological Communications*. 5:44

- [68] Grünewald FS., Prota AE., Giese A., Ballmer-Hofer K. (2010). Structure-function analysis of VEGF receptor activation and the role of coreceptors in angiogenic signaling. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1804: 567-580
- [69] Claesson-Welsh L. (2003). Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochemical Society Transactions*. 31:20-24
- [70] Ferrara N. (2004). Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine Reviews*. 25:581-611
- [71] Ferrara N., Gerber HP., Lecouter J. (2003). The biology of VEGF and its receptor. *Nature Medicine*. 9:669-676
- [72] Nagy JA., Dvorak AM., Dvorak HF. (2007). VEGF-A and the induction of pathological angiogenesis. *Annual Review of pathology: Mechanisms of Disease*. 2:251-275
- [73] Olsson AK., Dimberg A., Kreuger J., Claesson-Welsh L. (2006). VEGF receptor signaling in control of vascular function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 7:359-371
- [74] Kowanetz M., Ferrara N. (2006). Vascular endothelial growth factor signaling pathways: Therapeutic Perspective. *Clinical Cancer Research*. 12:5018-5022
- [75] Rousseau S., Houle François., Landry J., Huot J. (1997). p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene*. 15:2169-2177
- [76] Gerber HP., McMurtrey A., Kowalski J., Yan M., Keyt BA., Dixit V., Ferrara N. (1998). Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *The Journal of Biological Chemistry*. 273:30336-30343
- [77] Jiang T., Zhuang J., Duan H., Luo Y., Zeng Q., Fan K., Yan H., Lu D., Ye Z., Hao J., Feng J., Yang D., Yan X. (2012). CD146 is a coreceptor for VEGFR-2 in tumor angiogenesis. *Blood*. 120:2330-2339
- [78] Fong G., Zhang L., Bryce DM., Peng J. (1999). Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization is the primary defect in the flt-1 knock-out mice. *Development*. 126:3015-3025
- [79] Waltenberger J., Claesson-Welsh L., Siegbahn A., Shibuya M., Heldin CH. (1994). Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *The Journal of Biological Chemistry*. 269:26988-26995
- [80] Shalaby F., Rossant J., Yamaguchi TP., Gertsenstein M., Wu XF., Breitman ML., Schuh AC. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 376:62-66

- [81] Ebos JM., Bocci G., Thorpe PE., Hicklin DJ., Zhou D., Jia X., Kerbel RS. (2004). A naturally occurring soluble form of vascular endothelial growth factor receptor 2 detected in mouse and human plasma. *Molecular Cancer Research*. 2:315-326
- [82] Cébe-Suarez S., Zehnder-Fjällman A., Ballmer-Hofer K. (2006). The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 63:601-615
- [83] Carmeliet P., Moons L., Luttun A., Vincenti V., Compernelle V., De Mol M., Wu Y., Bono F., Devy L., Beck H., Scholz D., Acker T., DiPalma T., Dewerchin M., Noel A., Stalmans I., Barra A., Blacher S., VandenDriessche T., Ponten A., Eriksson U., Plate KH., Foidart JM., Schaper W., Charnock-Jones DS., Hicklin DJ., Herbert JM., Collen D., Persico MG. (2001). Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasion in pathological conditions. *Nature Medicine*. 7:575-583
- [84] Auterio M., Waltenberger J., Communi D., Kranz A., Moons L., Lambrechts D., Kroll J., Plaisance S., De Mol M., Bono F., Kliche S., Fellbrich G., Ballmer-Hofer K., Maglione D., Mayr-Beyrl U., Dewerchin M., Dombrowski S., Stanimirovic D., Van Hummelen P., Dehio C., Hicklin DJ., Persico G., Herbert JM., Communi D., Shibuya M., Collen D., Conway EM., Carmeliet P. (2003). Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nature Medicine*. 9:936-943
- [85] Guo HF., Vander Kooi CW. (2015). Neuropilin functions as an essential cell surface receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 290:29120-29126
- [86] Soker S., Takashima S., Miao HQ., Neufeld G., Klagsbrun M. (1998). Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*. 92:735-745
- [87] Lehmann JM., Holzmann B., Breitbart EW., Schmiegelow P., Riethmüller G., Johnson JP. (1987). Discrimination between benign and malignant cells of melanocytic lineage by two novel antigens, a glycoprotein with a molecular weight of 113,000 and a protein with a molecular weight of 76,000. *Cancer Research*. 47:841-845
- [88] George F., Poncelet P., Laurent JC., Massot O., Arnoux D., Lequeux N., Ambrosi P., Chicheportiche C., Sampol J. (1991). Cytofluorometric detection of human endothelial cells in whole blood using S-Endo 1 monoclonal antibody. *Journal of Immunological Methods*. 139:65-75
- [89] Wang Z., Yan X. (2012). CD146, a multi-functional molecule beyond adhesion. *Cancer letters*. 330:150-162
- [90] Taira E., Nagino T., Taniura H., Takaha N., Kim CH., Kuo CH., Li BS., Higuchi H., Miki N. (1995). Expression and functional analysis of a novel isoform of gicerin, an immunoglobulin superfamily cell adhesion molecule. *Journal of Biological Chemistry*. 270:28681-28687

- [91] Alais S., Allioli N., Pujades C., Duband JL., Vainio O., Imhof BA., Dunon D. (2001). HEMCAM/CD146 downregulates cell surface expression of beta1 integrins. *Journal of cell science*. 114:1847-1859
- [92] Bardin N., Francès V., Combes V., Sampol J., Dignat-George F. (1998). CD146: biosynthesis and production of a soluble form in human cultured endothelial cells. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 421:12–14
- [93] Boneberg EM., Illges H., Legler DF., Fürstenberger G. (2009). Soluble CD146 is generated by ectodomain shedding of membrane CD146 in a calcium-induced, matrix metalloprotease-dependent process. *Microvascular Research*. 78:325-331
- [94] Kebir A., Harhour K., Guillet B., Liu JW., Foucault-Bertaud A., Kaspi E., Elganfoud N., Vely F., Sabatier F., Samol J., Pisano P., Kruithof EK., Bardin N., Dignat-George F., Blot-Chabaud M. (2010). CD146 short isoform increases the proangiogenic potential of endothelial progenitor cells in vitro and in vivo. *Circulation Research*. 107:66-75
- [95] Stalin J., Harhour K., Hubert L., Garrigue P., Nollet M., Esaadi A., Muller A., Foucault-Bertrand A., Bachelier R., Sabatier S., Pisano P., Peiretti F., Leroyer AS., Guillet B., Bardin N., Dignat-George F., Blot-Chabaud M. (2016). Soluble CD146 boosts therapeutic effect of endothelial progenitors through proteolytic processing of short CD146 isoform. *Cardiovascular Research*. 11:240-251
- [96] Chan B., Sinha S., Cho D., Ramchandran R., Sukhatme VP. (2005) Critical roles of CD146 in zebrafish vascular development. *Developmental Dynamics*. 232:232-244
- [97] Harhour K., Kebir A., Guillet B., Foucault-Bertaud A., Voytenko S., Piercecchi-Marti MD., Berenguer C., Lamy E., Vely F., Pisano P., Ouafik L., Sabatier F., Sampol J., Bardin N., Dignat-George F., Blot-Chabaud M. (2010). Soluble CD146 displays angiogenic properties and promotes neovascularization in experimental hind-limb ischemia. *Blood*. 115:3843-3851
- [98] Stalin J., Harhour K., Hubert L., Subrini C., Lafitte D., Lissitzky JC., Elganfoud N., Robert S., Foucault-Bertaud A., Kaspi E., Sabatier F., Aurrand-Lions M., Bardin N., Holmgren L., Dignat-George F., Blot-Chabaud M. (2013). Soluble melanoma cell adhesion molecule (sMCAM/sCD146) promotes angiogenic effects on endothelial progenitor cells through angiomin. *Journal of Biological Chemistry*. 288:8991-9000
- [99] Bardin N., Blot-Chabaud M., Despoix N., Kebir A., Harhour K., Arsanto JP., Espinosa L., Perrin P., Robert S., Vely F., Sabatier F., Le Bivic A., Kaplanski G., Sampol J., Dignat-George F. (2009). CD146 and its soluble form regulate monocyte transendothelial migration. *Arteriosclerosis, thrombosis, and Vascular Biology*. 29:746-753
- [100] Benirschke K., Kaufmann P. (1991). Early development of the human placenta. In: Benirschke K, Kaufmann P, eds. Pathology of the Human Placenta. Springer-Verlag, New York, pp. 13–21.

- [101] Gude NM1., Roberts CT., Kalionis B., King RG. (2004). Growth and function of the normal human placenta. *Thrombosis Research*. 114:397-407
- [102] Alsat E., Guibourdenche J., Couturier A., Evain-Brion D. (1998). Physiological role of human placental growth hormone. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 140:121-127.
- [103] Blaise S., De Parseval N., Bénit L., Heidmann T. (2003). Genomewide screening for fusogenic human endogenous retrovirus envelopes identifies syncytin 2, a gene conserved on primate evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100:13013–13018
- [104] Dupressoir A., Lavialle C., Heidmann T. (2012). From ancestral infectious retroviruses to bona fide cellular genes: role of the captured syncytins in placentation. *Placenta*. 33:633-671
- [105] Aplin JD. (1991). Implantation, trophoblast differentiation and haemochorial placentation: mechanistic evidence in vivo and in vitro. *Journal of Cell Science*. 99:681-692
- [106] Cross JC., Werb Z., Fisher SJ. (1994). Implantation and the placenta; key pieces of the development puzzle. *Science*. 226:1508-1518
- [107] Kaufmann P., Scheffen I. (1990). Placenta development. In: Polin R, Fox W, eds. Neonatal and fetal medicine-physiology and pathophysiology. Orlando: Saunders.
- [108] Benirschke K., Kaufmann P. (2000). Basic structure of the villous tree. In: Benirschke K, Kaufmann P, eds. Pathology of the Human Placenta. New-York: Springer-Verlag. 1990:22-70
- [109] Evain-Brion D. (2001). Les deux voies de différenciation du trophoblaste humain. *Gynécologie, Obstétrique & Fertilité*. 29 :497-502
- [110] Pijnenborg R., Vercruyse L., Hanssens M. (2006). The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta*. 27:939-958
- [111] Duc Goiran P., Malassiné A., Alsat E., Chaouat G. (1994). Unité foeto-placentaire et nouvelles molécules informatives. In : Dossier Documentaire – Inserm. Transmettre la vie à l’aube du XXIe siècle, Nathan, Paris, p. 111-114
- [112] Achen MG., Gad JM., Stacker SA., Wilks AF. (1997). Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor are co-expressed during early embryonic development. *Growth Factors*. 15:69-80
- [113] Plaisier M., Rodrigues S., Willems F., Koolwijk P., Van Hinsbergh VW., Helmerhorst FM. (2007). Different degrees of vascularization and their relationship to the expression of vascular endothelial growth factor, placental growth factor, angiopoietins, and their receptors in first-trimester decidual tissues. *Fertility Sterility*. 88:176-187
- [114] Cooper JC., Sharkey AM., Charnock-Jones DS., Palmer CR., Smith SK. (1996). VEGF mRNA levels in placentae from pregnancies complicated by pre-eclampsia. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 103:1191-1196

- [115] Kingdom J., Huppertz B., Seaward G., Kaufmann P. (2000). Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*. 92:35-43
- [116] Khaliq A., Li XF., Shams M., Sisi P., Acevedo CA., Whittle MJ., Weich H. Ahmed A. (1996). Localization of placenta growth factor (PlGF) in human term placenta. *Growth Factors*. 13:243-250
- [117] He Y., Smith SK., Day KA., Clark DE., Licence DR., Charnock-Jones DS. (1999). Alternative splicing of vascular endothelial growth factor (VEGF)-R1 (FLT-1) pre-mRNA is important for the regulation of VEGF activity. *Molecular Endocrinology*. 13:337-345
- [118] Luttun A., Carmeliet P. (2003). Soluble VEGF receptor Flt1: the elusive preeclampsia factor discovered? *Journal of Clinical Investigation*. 111:600-602
- [119] Tsatsaris V., Goffin F., Munaut C., Brichant JF., Pignon MR., Noel A., Schaaps JP., Cabrol D., Franckenne F., foidart JM. (2003). Overexpression of the soluble vascular endothelial growth factor receptor in preeclamptic patients: pathophysiological consequences. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 88:5555-5563
- [120] Friedman AM., Cleary KL. (2014). Prediction and prevention of ischemic placental disease. *Seminars in Perinatology*. 38:117-182
- [121] Souders CA., Maynard SE., Yan J., Wang Y., Boatright NK., Sedan J., Balyozian D., Cheslock PS., Molrine DC., Simas TA. (2015). Circulating levels of sFlt1 splice variants as predictive markers for the development of preeclampsia. *International Journal of Molecular Sciences*. 16:12436-12453
- [122] Saleh L., Verdonk K., Visser W., van den Meiracker AH., Danser AH. (2016). The emerging role of endothelin-1 in the pathogenesis of pre-eclampsia. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*. 10:282-293
- [123] Biberoglu E., Kirbas A., Daglar K., Biberoglu K., Timur H., Demirtas C., Karabulut E., Danisman N. (2016). Serum angiogenic profile in abnormal placentation. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 29:3193-3197
- [124] Downs KM., Bertler C. (2000). Growth in the pre-fusion murine allantois. *Anatomy and Embryology*. 202:323-331
- [125] Maltepe E., Bakardjiev AI., Fisher SJ. (2010). The placenta: transcriptional, epigenetic, and physiological integration during development. *The American Society for Clinical Investigation*. 120:1016-1025
- [126] Simister NE. (2003). Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine*. 21:3365-3369

- [127] Cleal JK., Lewis RM. (2008). The mechanisms and regulation of placental amino acid transport to the human fetus. *Journal of Neuroendocrinology*. 20:419-426
- [128] Beall MH., van den Wijngaard JPHM., van Gemert MJC., Ross MG. (2007). Regulation of amniotic fluid volume. *Placenta*. 28:824-832
- [129] Yang J., Giu H., Qu P., Zhang R., Zeng L., Yan H. (2015). Prenatal alcohol exposure and congenital heart defects: a meta-analysis. *PLoS One*. 10:e0130681
- [130] Gundogan F., Gilligan J., Qi W., Chen E., Naram R., de la Monte M. (2015). Dose effect of gestational ethanol exposure on placentation and fetal growth. *Placenta*. 36:523-530
- [131] Popova S., Lange S., Shield K., Mihic A., Chudley AE., Mukherjee RAS., Bekmuradov D., Rehm J. (2016). Comorbidity of fetal alcohol spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 387:978-987
- [132] Burd L., Roberts D., Olson M., Odendaal H. (2007). Ethanol and the placenta: a review. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 20:361-375
- [133] Rosenberg MJ., Wolff CR., El-Emawy A., staples MC., Perrone-Bizzozero NI., Savage DD. (2010). Effects of moderate drinking during pregnancy on placental gene expression. *Alcohol*. 44:673-690
- [134] O’Keeffe GW., Kenny LC. (2014). Predicting infant neurodevelopmental outcomes using the placenta? *Trends in Molecular Medicine*. 20:303-305
- [135] Davis-Anderson KL., Berger S., Lunde-Young ER., Naik VD., Seo H., Johnson GA., Steen H., Ramadoss J. (2017). Placental proteomics reveal insights into fetal alcohol spectrum disorders. *Alcoholism: Clinical and Experiment Research*. 41:1551-1558
- [136] Dehaene P. (1995). La grossesse et l’alcool. Presses Universitaires de France, Que Sais-Je, Paris.
- [137] Nicloux M. (1900). Recherches expérimentales sur l’élimination de l’alcool dans l’organisme. Détermination d’un « alcoolisme congénital ». Octave Doin, Paris.
- [138] Germanaud D., Toutain S. (2017). Exposition prénatale à l’alcool et troubles causés par l’alcoolisation fœtale. *Contraste*. 46:39-102
- [139] Astley SJ. (2006). Comparison of the 4-digit diagnostic code and the Hoyme diagnostic guidelines for fetal alcohol spectrum disorders. *Pediatrics*. 118:1532-1545
- [140] Chudley AE., Conry J., Cook JL., Looock C., Rosales T., LeBlanc N. (2005). Fetal alcohol spectrum disorder: Canadian guidelines for diagnosis. *Journal de l’Association Médicale Canadienne*. 172:S1-S21

- [141] Guyet S. (2009). Aspects économiques de la prise en charge médico-sociale du syndrome d'alcoolisation fœtale : à propos de 15 enfants suivis au groupe hospitalier du Havre entre 2002 et 2008. Faculté mixte de médecine et pharmacie de Rouen.
- [142] Popova S., Lange S., Probst C., Gmel G., Rehm J. (2017). Estimation of national, regional, and global prevalence of alcohol use during pregnancy and fetal alcohol syndrome: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Global Health*. 5:e290-299
- [143] World Health Organization. Global status report on alcohol and health. https://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/gsr_2018/en 2018.
- [144] Burd L., Blair J., Dropps K. (2012). Prenatal alcohol exposure, blood alcohol concentrations and alcohol elimination rates for the mother, fetus and newborn. *Journal of Perinatology*. 32:652-659
- [145] Deitrich RA., Zimatkin SM., Pronko S. (2006). Oxidation of ethanol in the brain and its consequences. *Alcohol Research & Health: The Journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*. 29:266-273
- [146] Lipinski CA., Lombardo F., Dominy BW., Feeney PJ. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 46:3-26
- [147] Wong AD., Ye M., Levy AF., Rothstein JD., Bergles DE., Searson PC. (2013). The blood-brain barrier: an engineering perspective. *Frontiers in Neuroengineering*. 6:7
- [148] Société Française d'alcoologie. (2001). Les conduits d'alcoolisation : lecture critique des classifications et définitions. Quel objectif thérapeutique ? Pour quel patient ? Sur quels critères ? *Alcoologie et addictologie*. 23:67S-75S
- [149] Expertise collective Inserm. (2001). Alcool : Effets sur la santé. Rapport, Paris : Les éditions Inserm, XII-358p
- [150] Clarke ME., Gibbard WB. (2003). Overview of fetal alcohol spectrum disorders for mental health professionals. *The Canadian Child and Adolescent Psychiatry Review*. 12:57-63
- [151] Sulik KK. (2005). Genesis of alcohol-induced craniofacial dysmorphism. *Experimental Biology and Medicine*. 230:366-375
- [152] Deltour L., Ang H.L., Duester G. (1996). Ethanol inhibition of retinoic acid synthesis as a potential mechanism for fetal alcohol syndrome. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*. 10:1050-1057
- [153] Shabtai Y., Bendelac L., Jubran H., Hirschberg J., Fainsod A. (2018). Acetaldehyde inhibits retinoic acid biosynthesis to mediate alcohol teratogenicity. *Scientific reports*. 8:347

- [154] El Fatimy R., Miozzo F., Le Mouët A., Abane R., Schwendimann L., Sabéran-Djoneidi D., De Thonel A., Massaoudi I., Paslaru L., Hashimoto-Torii K., Christians E., Rakic P., Gressens P., Mezger V. (2014). Heat shock factor 2 is a stress-responsive mediator of neuronal migration defects in models of fetal alcohol syndrome. *EMBO Molecular Medicine*. 6:1043-1061
- [155] Luo J., Miller MW. (1998). Growth factor-mediated neural proliferation: target of ethanol toxicity. *Brain Research Reviews*. 27:157-167
- [156] Ikonomidou C., Bittigau P., Ishiùaru MJ., Wozniak DF., Genz K., Price MT., Stefovská V., Hörster F., Tenkova T., Dikranian K., Olney JW. (2000). Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science*. 287:1056-1060
- [157] Naseer MI., Ullah I., Rasool M., Ansari SA., Sheikh IA., bibi F., Chaudhary AG., Al-Qahtani MH., Kim, MOK. (2014). Downregulation of dopamine D1 receptors and increased neuronal apoptosis upon ethanol and PTZ exposure in prenatal rat cortical and hippocampal neurons. *Neurological sciences*. 35:1681-1688
- [158] Manzo-Avalos S., Saavedra-Molina A. (2010). Cellular and Mitochondrial Effects of Alcohol Consumption. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 7:4281-4304
- [159] Coutts DJ. et Harrison NL. (2015). Acetaldehyde, not ethanol, impairs myelin formation and viability in primary mouse oligodendrocytes. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*. 39:455-462
- [160] Jégou S., El Ghazi F., de Lendeu PK., Marret S., Laudenbach V., Uguen A., Marcorelles P., Roy V., Laquerrière A., Gonzalez BJ. (2012). Prenatal alcohol exposure affects vasculature development in the neonatal brain. *Annals of Neurology*. 72:952-960
- [161] Miller MW. (1993). Migration of cortical neurons is altered by gestational exposure to ethanol. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 17:304-314
- [162] Sowell ER., Jernigan TL., Mattson SN., Riley EP., Sobel DF., Jones KL. (1996). Abnormal development of the cerebellar vermis in children prenatally exposed to alcohol: size reduction in lobules I-V. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 20:31-34
- [163] Lebel C., Rousotte F., Sowell ER. (2011). Imaging the impact of prenatal alcohol exposure on the structure of the developing human brain. *Neuropsychology Review*. 21:102-118
- [164] Williams JK., Baptista PM., Daunais JB., Szeliga KT., Friedman DP., Soker S. (2008). The effects of ethanol consumption on vasculogenesis potential in nonhuman primates. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*. 32:155-161

- [165] Radek KA., Kovacs EJ., Gallo RL., DiPietro LA. (2008). Acute ethanol exposure disrupts VEGF receptor cell signaling in endothelial cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 295:174-184
- [166] Deitrich RA., Dunwiddie TV., Harris RA., Erwin VG. (1989). Mechanism of action of ethanol: initial central nervous system actions. *Pharmacological Reviews*. 41:489-537
- [167] Nevo I., Hamon M. (1995). Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms involved in alcohol abuse and alcoholism. *Neurochemistry International*. 26:305-336
- [168] Zorumski CF., Mennerick S., Izumi Y. Acute and chronic effects of ethanol on learning-related synaptic plasticity. *Alcohol*. 48:1-17
- [169] Farley NM., Mihic SJ. (2015). Allosteric modulation of the glycine receptor activated by agonists differing in efficacy. *Brain Research*. 1606-95-101
- [170] Bird CW., Candelaria-Cook FT., Magcalas CM., Davies S., Valenzuela CF., Savage DD., Hamilton DA. (2015). Moderate prenatal alcohol exposure enhances GluN2B containing NMDA receptor binding and ifenprodil sensitivity in rat agranular insular cortex. *PLoS One*. 10:e0118721
- [171] Cuzon VC., Yeh PW., Yanagawa Y., Obata K., Yeh HH. (2008). Ethanol consumption during early pregnancy alters the disposition of tangentially migrating GABAergic interneurons in the fetal cortex. *The Journal of Neuroscience: The official Journal of the Society for Neuroscience*. 28:1854-1864
- [172] Buske C., Gerlai R. (2011). Early embryonic ethanol exposure impairs shoaling and the dopaminergic and serotonergic systems in adult zebrafish. *Neurotoxicology and Teratology*. 33:698-707
- [173] Fernandes Y., Rampersad M., Gerlai R. (2015). Embryonic alcohol exposure impairs the dopaminergic system and social behavioral responses in adult zebrafish. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*. 18
- [174] Ceccarini J., Hompes T., Verhaeghen A., Casteels C., Peuskens H., Bormans G., Claes S., Van Laere K. (2014). Changes in cerebral CB1 receptor availability after acute and chronic alcohol abuse and monitored abstinence. *The Journal of Neuroscience: The official Journal of the Society for Neuroscience*. 34:2822-2831
- [175] Resendiz M., Chen Y., Oztürk NC., Zhou FC. (2013). Epigenetic medicine and fetal alcohol spectrum disorders. *Epigenomics*. 5:73-86
- [176] Subbanna S., Nagre NN., Umopathy NS., Pace BS., Basavarajappa BS. (2014). Ethanol exposure induces neonatal neurodegeneration by enhancing CB1R Exon1 histone H4K8 acetylation and up-regulating CB1R function causing neurobehavioral abnormalities in adult mice. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*. 18

- [177] Solonskii AV., Logvinov SV., Kutepova NA. (2008). Development of brain vessels in human embryos and fetuses in conditions of prenatal exposure to alcohol. *Neurosciences and Neurobehavioral Physiology*. 38:373-376
- [178] Lewandowska E., Stępień T., Wierzba-Bobrowicz T., Felczak P., Szpak GM., Pasennik E. (2012). Alcohol-induced changes in the developing cerebellum. Ultrastructural and quantitative analysis of neurons on the cerebellar cortex. *Folia Neuropathologica*. 50 :397-406
- [179] Guerri C., Pascual M., Renau-Piqueras J. (2001). Glia and fetal alcohol syndrome. *Neurotoxicology*. 22:593-99
- [180] Chasnoff IJ., Wells AM., King L. (2015). Misdiagnosis and missed diagnoses in foster and adopted children with prenatal alcohol exposure. *Pediatrics*. 135:2
- [181] Luca M., Hunt B., Bucana CD., Johnson JP., Fidler IJ., Bar-Elia M. (1993). Direct correlation between MUC18 expression and metastatic potential of human melanoma cells. *Melanoma Research*. 3:35-41
- [182] Xie S., Luca M., Huang S., Gutman M., Reich R., Johnson JP., Bar-Eli M. (1997). Expression of MCAM/MUC18 by human melanoma cells leads to increased tumor growth and metastasis. *Cancer Research*. 57:2295-2303
- [183] Lei X., Guan CW., Song Y., Wang H. (2015). The multifaceted role of CD146/MCAM in the promotion of melanoma progression. *Cancer Cell International*. 15:3
- [184] Weninger W., Rendl M., Mildner M., Mayer C., Geusau A., Bayer G., Tanew A. Majdic O., Tschachler E. (2000). Keratinocytes express the CD146 (Muc18/S-Endo) antigen in tissue culture and during inflammatory skin diseases. *Journal of Investigative Dermatology*. 115:219-224
- [185] Bardin N., Moal V., Anfosso F., Daniel L., Brunet P., Sampol J., Dignat George F. (2003). Soluble CD146, a novel endothelial marker, is increased in physiopathological settings linked to endothelial junctional alteration. *Thrombosis and Haemostasis*. 90:915-920
- [186] Bardin N., Reumaux D., Geboes K., Colombel JF., Blot-Chabaud M., Sampol J., Duthilleul P., Dignat-George F. (2006). Increased expression of CD146, a new marker of the endothelial junction in active inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*. 12:16-21
- [187] Neidhart M., Wehrli R., Brühlmann P., Michel BA., Gay RE., Gay S. (2001). Synovial fluid CD146 (MUC18), a marker for synovial membrane angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*. 42:622-630
- [188] Shih IM. (1999). The role of CD146 (Mel-CAM) in biology and pathology. *The Journal of Pathology*. 189:4-11
- [189] Kaspi E., Guillet B., Piercecchi-Marti MD., Alfaidy N., Bretelle F., Bertaud-Foucault A., Stalin J., Rambelolon L., Lacroix O., Blot-Chabaud M., Dignat-George F., Bardin N. (2013).

Identification of soluble CD146 as a regulator of trophoblast migration: potential role in placental vascular development. *Angiogenesis*. 16:329–342

[190] Bardin N., Anfosso F., Massé JM., Cramer E., Sabatier F., Le Bivic A., Sampol J., Dignat-George F. (2001). Identification of CD146 as a component of the endothelial junction involved in the control of cell-cell cohesion. *Blood*. 98:3677-3684

[191] Chen J., Luo Y., Hui H., Cai T., Huang H., Yang F., Feng J., Zhang J., Yan X. (2017). CD146 coordinates brain endothelial cell-pericyte communication for blood-brain barrier development. *PNAS*. 114:E7622-E7631

[192] Tu T., Gao Q., Luo Y., Chen J., Lu D., Feng J., Yang D., Song L., Yan X. (2013). CD146 deletion in the nervous system impairs appetite, locomotor activity and spatial learning in mice. *PLoS One*. 8:e74124

[193] Cai L., Sutter BM., Li B., Tu BP. (2011). Acetyl-CoA induces cell growth and proliferation by promoting the acetylation of histones at growth genes. *Molecular Cell*. 42:426-437

[194] Duan H., Xing S., Luo Y., Feng L., Gramaglia I., Zhang Y., Lu D., Zeng Q., Fan K., Feng J., Yang D., Qin Z., Couraud PO., Romero IA., Weksler B., Yan X. (2013). Targeting endothelial CD146 attenuates neuroinflammation by limiting lymphocyte extravasion to the CNS. *Scientific Reports*. 3:1687

[195] Rubert G., Miñara R., Pascual M., Guerri C. (2006). Ethanol exposure during embryogenesis decreases the radial glial progenitor pool and affects the generation of neurons and astrocytes. *Journal of Neuroscience Research*. 84:483-496

[196] Volk B., Maletz J., Tiedemann M., Mall G., Klein C., Berlet HH. (1981). Impaired maturation of Purkinje cells in the fetal alcohol syndrome of the rat. Light and electron microscopic investigations. *Acta Neuropathologica*. 54:19-29

[197] Creeley CE., Dikranian KT., Johnson SA., Farber NB., Olney JW. (2013). Alcohol-induced apoptosis of oligodendrocytes in the fetal macaque brain. *Acta Neuropathologica Communications*. 1:23

[198] Farber NB., Creeley CE., Olney JW. (2010). Alcohol-induced neuroapoptosis in the fetal macaque brain. *Neurobiology of Disease*. 40:200-206

[199] Kay VR., Tayade C., Carmeliet P., Croy BA. (2017). Influences of placental growth factor on mouse retinal vascular development. *Developmental Dynamics*. 246:700-712

[200] Sautreuil C., Laquerrière A., Lecuyer M., Brasse-Lagnel C., Jégou S., Bekri S., Marcotelles P., Gil S., Marret S., Gonzalez BJ. (2019). Alcoolisation foétale : le placenta au secours du diagnostic précoce des troubles du développement cérébral de l'enfant. Accepted in *Médecine/Sciences*.

[201] Terasaki LS., Schwarz JM. (2016). Effects of moderate prenatal alcohol exposure during early gestation in rats on inflammation across the maternal-fetal-immune interface and later-life immune function in the offspring. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 11:680-692

[202] Lan N., Chiu MPY., Ellis L., Weinberg J. (2017). Prenatal alcohol exposure and prenatal stress differentially alter glucocorticoid signaling in the placenta and fetal brain. *Neuroscience*. 342:167-179

